

Untersuchungen zu purinnukleotidvermittelter Lipolyseregulation in Rattenadipozyten

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

Ina Weise

geboren am 18.04.1979 in Jena

Gutachter:

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.09.2005

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2MeSADP, 2MeSATP	2-Methylthio-Adenosindiphosphat, -triphosphat
ADA	Adenosindeaminase
ALBP	Adipocyte lipidbinding protein
Ap4A	Diadenosintetraphosphat
ATP, ADP, AMP	Adenosintriphosphat, -diphosphat, -monophosphat
ATP _γ S	Adenosin-5'-O-(3-Thiotrisulfat)
α,β-Me-ATP	α,β-Methylen-Adenosintriphosphat
β,γ-Me-ATP	β,γ-Methylen-Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BzATP	3'-O-(4 -Benzoyl)Benzoyl- Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EC ₅₀	Konzentration einer Substanz, deren Wirkung an einem Rezeptor 50 % der maximal auslösbaren Wirkung entspricht
enger.	eingereicht
FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	Glyzerolaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GPDH	Glyzerol-3-phosphatdehydrogenase
GK	Glyzerokinase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HSL	hormonsensitive Lipase
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
ITP	Inosintriphosphat
KRH-Puffer	Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer
LDH	Lactatdehydrogenase
μM, mM	mikro-, millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure

mndl.	mündlich
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid
PDE	Phosphodiesterase
PLC	Phospholipase C
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PKA	Proteinkinase A
PP _i	Pyrophosphat
rpm	rounds per minute
SD ₀ -Medium	serumfreies Zellkulturmedium
TG	Triacylglyzerid
TIM	Triosephosphatisomerase
TRAM-Puffer	Triethanolamin-Puffer
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
UTP, UDP	Uridintriphosphat, -diphosphat
UTP _γ S	Uridin-(O-3-Thiotriphosphat)

SI-Einheiten wurden in üblicher Weise abgekürzt.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	5
1. EINLEITUNG	7
1.1. Fettgewebe und Lipolyseregulation	7
1.2. Die Wirkung von Purin- und Pyrimidinnukleotiden wird durch verschiedene P2-Rezeptoren vermittelt	10
1.2.1. P2X-Rezeptoren	12
1.2.2. P2Y-Rezeptoren	14
1.3. Purinozeptoren und intrazellulärer Lipidstoffwechsel in Adipozyten	16
2. ZIELSTELLUNG	17
3. TIERE, MATERIALIEN UND METHODEN	17
3.1. Tiere	17
3.2. Materialien	17
3.2.1. Chemikalien	17
3.2.2. Enzyme	18
3.2.3. Sonstiges	19
3.2.4. Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer und Lösungen	19
3.3. Gewinnung und Vorbehandlung der Zellen	19
3.4. Der photometrische Glyzerinnachweis	20
3.4.1. Glyzerinquantifizierung in Adipozytenpräparationen	20
3.4.1.1. Inkubation und Lyse der Zellen	20
3.4.1.2. Glyzerinmessung am Spektrophotometer	21
3.4.2. Quantifizierung der Fettzellmenge	22
3.4.2.1. Probenvorbereitung	22
3.4.2.2. Messung und Auswertung des Triglyzeridgehaltes	23
3.4.3. Auswertung der photometrischen Daten	23
3.5. Der luminometrische Glyzerinnachweis	24
3.5.1. Inkubation und Lyse der Zellen	24
3.5.2. Probeninkubation zur Vorbereitung der Messung am Luminometer	25
3.5.3. Glyzerinmessung am Luminometer	26

3.5.4. Auswertung der luminometrischen Daten	27
3.6. Die Konzentrationsbestimmung von ATP in Adipozytenpräparationen	28
3.6.1. Inkubation und Lyse der Zellen	28
3.6.2. Messung und Auswertung der Daten	28
3.7. Statistische Verfahren	29
 4. ERGEBNISSE	 30
4.1. Extrazelluläres ATP in Adipozytenpräparationen – Konzentration und Halbwertszeit	30
4.2. β,γ -Me-ATP hemmt die basale, nicht durch Adenosin suppressierte Lipolyse	31
4.3. Der Einfluss von ATP, α,β -Me-ATP und β,γ -Me-ATP auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse	33
4.3.1. α,β -Me-ATP verstärkt die durch Isoproterenol stimulierte Lipolyse in Adipozyten	34
4.3.2. ATP und β,γ -Me-ATP verstärken die durch Insulin vermittelte Hemmung der isoproterenolstimulierten Lipolyse in Adipozyten	37
 5. DISKUSSION	 39
 6. LITERATURVERZEICHNIS	 46
 7. ANHANG	 53

ZUSAMMENFASSUNG

Purin- und Pyrimidinverbindungen wie ATP, UTP oder Adenosin sind wichtige Botenstoffe im menschlichen und tierischen Organismus. Sie wirken an den Zellen über verschiedene spezielle Rezeptoren, die sich in Ionenkanäle (P2X-Rezeptoren) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (P1- und P2Y-Rezeptoren) unterteilen. Diese Rezeptoren konnten bereits in vielen Geweben von Menschen und Nagern gezeigt und funktionell eingeordnet werden. Im Fettgewebe verschiedenster Spezies ist die Expression und Funktion eines P1-Rezeptors, des Adenosin-A1-Rezeptors, seit vielen Jahren bekannt und gut untersucht (Londos et al. 1978). Jedoch gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Rolle von P2-Rezeptoren im Fettgewebe. In Rattenadipozyten und humanen Präadipozyten wurde ein solcher P2-Rezeptor (P2X1) bereits nachgewiesen. Auch der P2Y1-Rezeptor wurde jüngst in Fettgewebe der Ratte gesichert. Im menschlichen Fettgewebe stimulieren Nukleotide die Aromataseaktivität und auch die Differenzierung von 3T3-L1-Präadipozyten wird durch ATP verstärkt. Es stellte sich nun die Frage, ob Purinnukleotide auch regulierend auf andere Funktionen des Fettgewebes, wie den Lipidstoffwechsel wirken.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Purinnukleotide Einfluss auf die Regulation der Lipolyse in Adipozyten der Ratte nehmen.

Als experimentelles System wurden isolierte Adipozyten des gonadalen und perirenal Fettgewebes männlicher Wistar-Ratten verwendet. Der Einfluss der untersuchten Agonisten auf die Lipolyse wurde durch Quantifizierung der dabei freigesetzten Glyzerinmenge über ein luminometrisches Testverfahren ermittelt. Die Zellpräparationen wurden unter Blockade der Adenosinrezeptoren (P1-Rezeptoren) getestet, um die vor allem über den A1-Rezeptor vermittelten antilipolytischen Effekte des extrazellulären Adenosins und des zu Adenosin abgebauten ATPs zu verhindern. Die Quantifizierung der Triglyzeridmenge je Versuchsansatz erfolgte mittels eines enzymatischen Tests im Spektrophotometer. Um eine Aussage über die Stabilität des natürlich vorkommenden, sowie des experimentell zugesetzten ATPs am Rezeptor machen zu können wurde die Halbwertszeit von ATP in den dabei verwendeten Adipozytenpräparationen bestimmt. Dies erfolgte durch ein weiteres luminometrisches Nachweisverfahren.

Es zeigte sich, dass im Zeitraum bis 90 min bei 50 μ M zugesetztem ATP die Konzentration an verfügbarem extrazellulärem ATP nicht unter 1 μ M absank, was etwa dem 50-fachen der natürlicherweise vorkommenden Menge an ATP in diesen Zellpräparationen entspricht. Die Halbwertszeit des zugesetzten ATPs unter diesen Bedingungen betrug ca. 20 Minuten.

Sämtliche durch Purinnukleotide vermittelten signifikanten Modulationen der Lipolyse in den untersuchten Zellpräparationen wurden innerhalb eines Zeitraumes von 60 min gemessen.

Die basale Lipolyse in den untersuchten Zellpräparationen wurde weder durch Insulin noch durch ATP oder α,β -Me-ATP modifiziert. Lediglich die Inkubation mit β,γ -Me-ATP führte zu einer Hemmung der Lipolyse innerhalb der ersten 60 min.

Bei gleichzeitig mit 10 μ M Isoproterenol stimulierten Adipozyten ließ sich eine gleichartig durch ATP und β,γ -Me-ATP verursachte Änderung des Triglyzeridabbaus nachweisen. Beide Substanzen verstärken in Kombination mit Insulin dessen antilipolytische Wirkung signifikant. Im Gegensatz zu diesen Nukleotiden zeigt α,β -Me-ATP ein abweichendes Verhalten. In Kombination mit Insulin sind die gemessenen Werte nahezu identisch mit den in Gegenwart von Insulin allein gemessenen Werten. Allein steigert α,β -Me-ATP die isoproterenolinduzierte Lipolyserate jedoch deutlich. β,γ -Me-ATP zeigt ohne den Einfluss von Insulin keine nachweisbare Wirkung. Auch die Ergebnisse für ATP allein unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollinkubationen. Eine tendenziell gesteigerte lipolytische Aktivität ist dabei jedoch zu diskutieren.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die verwendeten Purinnukleotide über mindestens 2 verschiedene P2-Rezeptoren auf den Fettstoffwechsel Einfluss nehmen. Die beiden bereits in Adipozyten der Ratte nachgewiesenen P2-Rezeptoren können jedoch nur zum Teil die oben beschriebenen Ergebnisse erklären. Von ihren bekannten Signaltransduktionsmechanismen her wirken sie eher gleichgerichtet über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Für einige P2Y-Rezeptoren konnten mittlerweile weitere Signaltransduktionsmechanismen gezeigt werden. Unter diesen ist aber bisher keiner mit einem passenden Agonistenprofil zu den in den Adipozyten gemessenen Ergebnissen vorhanden (Schödel 2003). Auch ein Nachweis weiterer P2-Rezeptoren in Rattenadipozyten war bisher noch nicht zu erbringen (Schmidt mndl. 2004).

Die Tatsache, dass für die untersuchten Purinnukleotide eindeutige regulatorische Effekte auf die Lipolyse in vitro nachweisbar waren, die sich zum Teil entgegengesetzt für die Lipogenese darstellten (Schödel 2003), zeigt, dass mit den Purinnukleotiden auch in vivo ein wichtiger Einflussfaktor auf den Lipidstoffwechsel in Adipozyten vorhanden sein könnte. Perspektivisch ist daher der Nachweis weiterer P2-Rezeptoren auf molekularer Ebene, so wie eine Verifizierung der intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen der verschiedenen untersuchten Nukleotide von Interesse.

1. EINLEITUNG

1.1. Fettgewebe und Lipolyseregulation

Das Fettgewebe ist der Energiespeicher des Organismus. Es besteht zu ca. 95 % aus Triglyzeriden, welche die eigentlichen Energielieferanten sind. Es ist ein „Organ“ mit wichtigen metabolischen Aufgaben. Dazu gehören sowohl Lipogenese und Lipolyse, als auch die Freisetzung von Hormonen, wie z.B. Östrogenen und Zytokinen (Frühbeck 2004). Diese Funktionen können in vivo und in vitro von einer Reihe von Botenstoffen beeinflusst werden. Beispiele dafür sind Insulin, Adenosin, Katecholamine, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine und andere. Um verstehen zu können, wie all diese Regulatoren koordiniert zusammenwirken, ist es notwendig die verschiedenen Einflussfaktoren auf den Metabolismus zu spezifizieren, und intrazelluläre Signalwege darzustellen. Dies trägt auch dazu bei, Abweichungen des Fettstoffwechsels im Organismus zu erkennen, um perspektivisch gezielt Störungen in diesem Metabolismus, wie Adipositas, behandeln zu können.

Eine Möglichkeit der Einflussnahme auf den Lipidstoffwechsel, stellt die Regulation der lipolytischen Aktivität der Fettzelle dar. Hauptangriffspunkt ist hierbei die hormonsensitive Lipase (HSL). Diese spaltet Triacylglycerin in Monoacylglycerin und zwei freie Fettsäuren, welche intrazellulär an „Adipocyte lipidbinding protein“ (ALBP) und andere fettsäurebindende Proteine gebunden werden. Sie wird durch die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) mittels Phosphorylierung in einen aktiven, Triglyzerid spaltenden Zustand versetzt. Des Weiteren phosphoryliert die PKA das die Lipidtröpfchen umgebende Perilipin. Damit werden die Lipide angreifbar für die HSL und die Triglyzeridspaltung erst möglich (Holm et al. 2000). Weitere intrazelluläre Lipasen und Esterasen führen dann zur Spaltung von Monoacylglycerin in Glycerin und eine weitere Fettsäure. Diese bisher favorisierte Theorie wird seit Kurzem von Zimmermann et al. (2004) zum Teil in Frage gestellt. Er postuliert eine weitere fettgewebsspezifische Lipase (ATGL) die Triacylglyceride in Diacylglyceride spaltet und damit auch Angriffspunkt für regulatorische Vorgänge sein kann. Die HSL metabolisiert in diesem Modell hauptsächlich Diacylglyceride.

Die lipolyseinduzierenden Signalwege, die zur Aktivierung der HSL bzw. der PKA führen werden schon lange untersucht, dabei wird der Modulation des intrazellulären cAMP-Spiegels eine zentrale Rolle zugeschrieben (Butcher et al. 1966, Fotovati et al. 2000). Trotzdem bestehen immer noch offene Fragen und die Regulation dieses Signalweges ist in vivo weit weniger geklärt, als in vitro.

In vitro zeigte sich eine sehr geringe basale Lipolyserate, sowohl in humanen, als auch in Rattenadipozyten. Kather et al. (1985) zeigten, dass Substanzen wie Adenosin und Prostaglandine, welche inhibierend auf die Lipolyse wirken und von den Zellen selbst produziert werden, dafür verantwortlich sind. Sie schlussfolgerten daraus, dass Lipolyse hauptsächlich durch die Modulation solcher inhibierender Substanzen reguliert würde. In vivo wurden Insulin, Katecholamine, Adenosin und Leptin als wichtige Modulatoren dargestellt (Kather et al. 1985, Green 1987, Frühbeck et al. 2001).

Zusätzlich zu den mit in-vivo-Wirkung genannten Substanzen wurden für einige physiologisch vorkommende oder pharmakologisch bedeutsame Substanzen Wirkungen auf die Lipolyse in vitro nachgewiesen. Beispiele dafür sind Pertussistoxin, Isoproterenol und Prostaglandin E₂.

Die wichtigsten antilipolytischen Hormone Insulin und Adenosin senken den cAMP-Spiegel auf verschiedenen Wegen. Adenosin wirkt in Adipozyten hauptsächlich über A₁-Rezeptoren hemmend auf die Adenylatzyklase (Green 1987, Vassaux et al. 1993). Insulin dagegen aktiviert hauptsächlich die Phosphodiesterase 3B (PDE_{3B}), die cAMP zu AMP abbaut. Weitere Phosphodiesterasen, wie die PDE₄, wirken über den gleichen Weg, jedoch in viel geringerem Umfang (Enoksson et al. 1998). Daneben wird für Insulin noch ein cAMP unabhängiger Weg der Lipolysehemmung postuliert. Hierbei aktiviert Insulin eine Proteinphosphatase, welche zu einer Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der HSL führt (Kather et al. 1985, Stralfors and Honnor 1989). Katecholamine als Induktoren der Lipolyse wirken über β_1 - und β_3 -Rezeptoren stimulierend auf die Adenylatzyklase und somit ebenfalls über eine Modulation des cAMP-Spiegels (Murphy et al. 1993, Louis et al. 2000). Zusätzlich fördern sie die Mobilisation der HSL aus dem zytoplasmatischen Kompartiment auf die Oberfläche der intrazellulären Lipidtröpfchen (Egan et al. 1992).

Abbildung 1 gibt einen vereinfachten Überblick über die Wege, welche zur Triglyzeridspaltung führen.

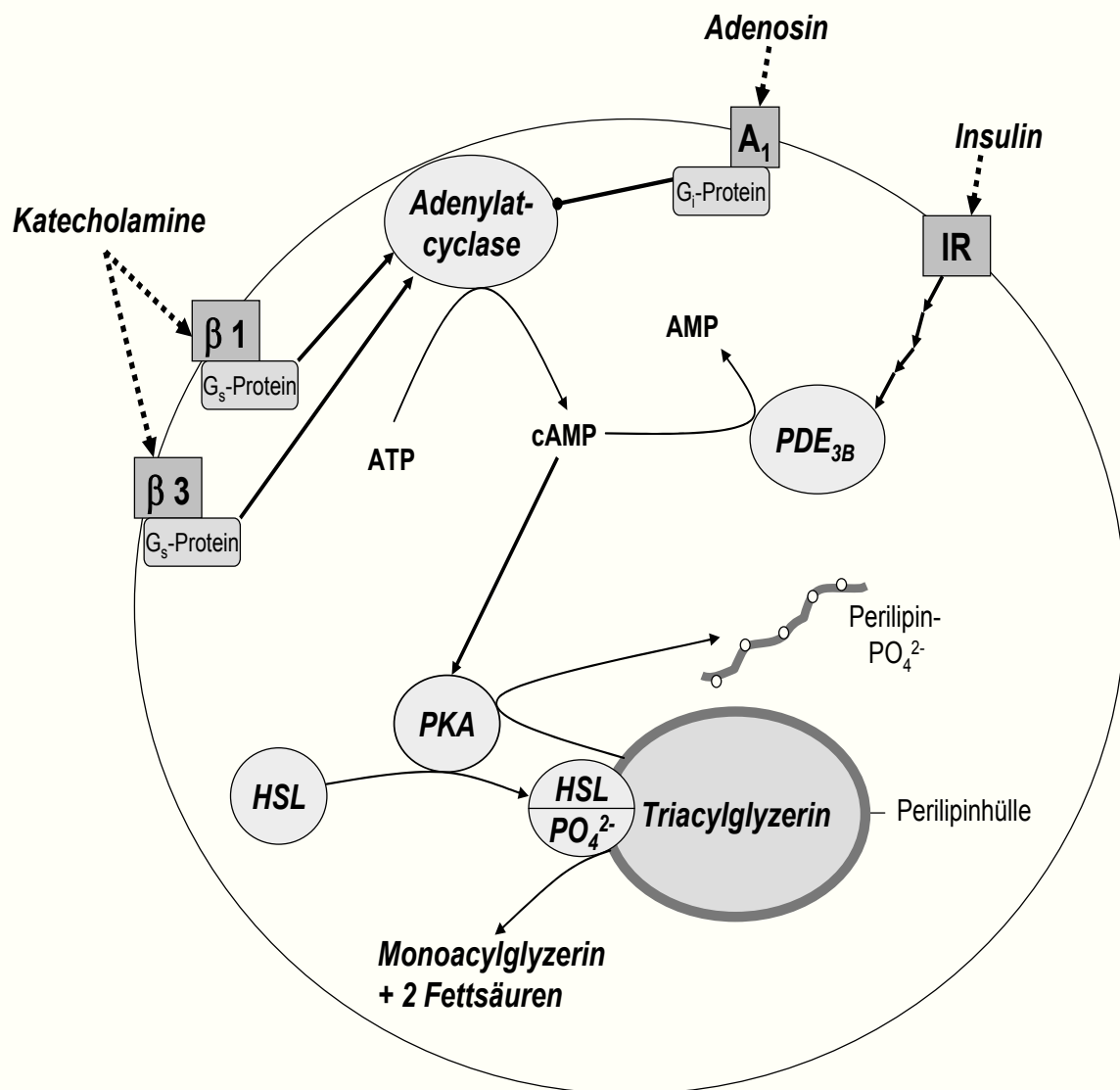


Abb.1: Lipolytische Signalwege in Adipozyten

A1 – Adenosin(A1)-Rezeptor, β1/β3 – β-Rezeptoren, HSL – hormonsensitive Lipase, IR – Insulinrezeptor, PDE_{3B} – Phosphodiesterase 3B, PKA – Proteinkinase A

.....▶ Wirkt am Rezeptor

————▶ Wird zu

————▶ Stimuliert

————● Hemmt

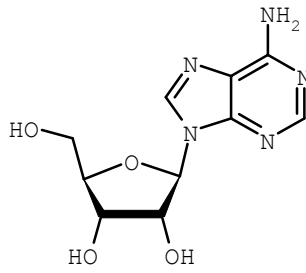
Zur Vereinfachung wurden zwischen Rezeptoren und Zielenzymen nicht alle Mediatoren dargestellt

1.2. Die Wirkung von Purin- und Pyrimidinnukleotiden wird durch verschiedene P2-Rezeptoren vermittelt

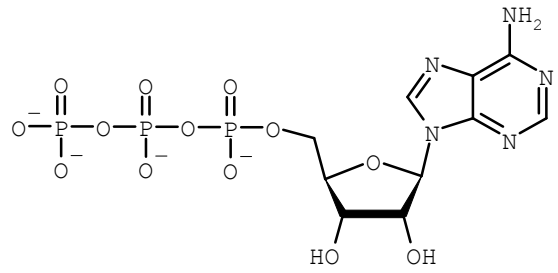
Extrazelluläre Purine, Purin- und Pyrimidinnukleotide wie Adenosin, ATP und UTP sind im menschlichen, wie auch im tierischen Organismus ubiquitär vorkommende wichtige Signalmoleküle. Sie sind involviert in Muskelkontraktion, Neurotransmission, Immunmodulation, Sekretion und Blutgerinnung (Ralevic and Burnstock 1998). Ihre Funktion als extrazelluläre Signalmoleküle wurde schon 1929 beschrieben (Drury and Szent-Györgyi 1929). Purine und Purinnukleotide wirken auf die Zelle über spezielle Rezeptoren. Diese unterteilen sich in G-Protein gekoppelte Adenosin- (A- oder P1-) Rezeptoren und in P2-Rezeptoren, an denen natürlicherweise phosphorylierte Purine und Pyrimidine, wie ATP und UTP wirken. P2-Rezeptoren wiederum unterteilen sich nach ihren Signaltransduktionsmechanismen in P2X-Rezeptoren (Ionenkanäle) und P2Y-Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren) (Benhan and Tsien 1987, Dubyak 1991). Früher erfolgte eine weitere Unterteilung, welche sich nach Ligandenspezifität und Organmanifestation richtete. Diese wird mittlerweile durch Sequenzanalyse und Rezeptorklonierung verifiziert.

Endogene Agonisten mit Wirkung an rekombinanten P2X- und P2Y-Rezeptoren sind z.B. ATP, ADP, UTP und UDP. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass auch AMP und Adenosin am neu identifizierten P2Y₁₅-Rezeptor wirken (Inbe et al. 2004). In vivo unterliegen all diese P2-Rezeptor-Liganden in den meisten Geweben einer schnellen Metabolisierung. Synthetische Abkömmlinge der Nukleotide, wie α,β - und β,γ -Me-ATP, sind jedoch oft stabiler gegen die Aktivität fast ubiquitär in Gewebe und Zellpräparationen vorkommender Ektonukleotidasen, was zu einer längeren oder stärkeren Wirkung dieser Agonisten am Rezeptor in vitro führen kann. Einige typische Agonisten an P2-Rezeptoren sind in Abb. 2 dargestellt.

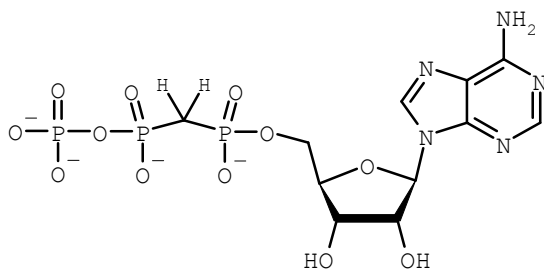
Es zeigte sich auch, dass verschiedene Purinnukleotide relativ spezifische Agonisten für bestimmte Rezeptorgruppen sind. So wirkt z.B. β,γ -Me-ATP spezifisch an einigen P2X-Rezeptoren (P2X₁ und P2X₃), UDP und UTP jedoch fast ausschließlich an P2Y-Rezeptoren (P2Y₄ und P2Y₆) (Ralevic and Burnstock 1998).



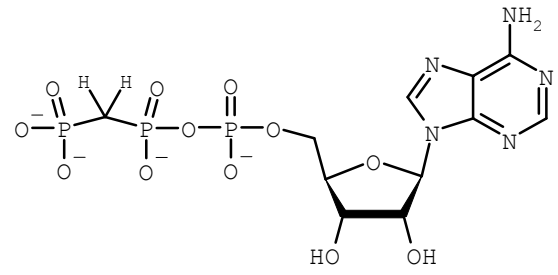
Adenosin



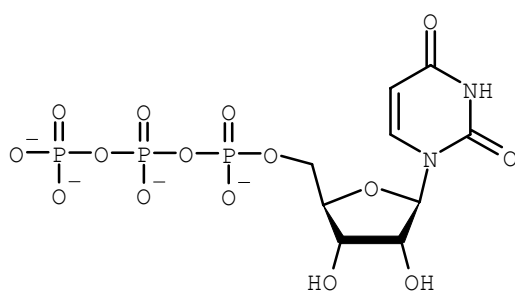
ATP



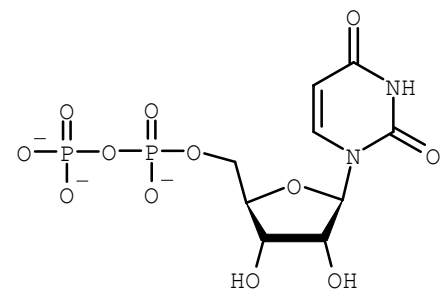
α,β-Me-ATP



β,γ-Me-ATP



UTP



UDP

Abb. 2: Ausgewählte Agonisten an Purinozeptoren

1.2.1. P2X-Rezeptoren

In vivo vorkommende P2X-Rezeptoren wurden in vielen Geweben bei Menschen und Nagern nachgewiesen. Es wurden bisher 7 P2X-Rezeptoruntereinheiten durch Klonierung unterschieden. Es handelt sich dabei um 379-595 Aminosäuren lange Proteine mit 2 Transmembrandomänen. Diese können sich zu 3, 4 oder vielfachen von 3 Untereinheiten zusammenlagern, so dass homomere und heteromere Ionenkanäle entstehen. Es handelt sich dabei um ATP-gekoppelte selektive Ionenkanäle für $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Na}^+ > \text{K}^+$. Eine Stimulation mit den dazugehörigen Agonisten führt innerhalb von ~ 10 Millisekunden zu einer Öffnung der Ionenkanäle, zur Membrandepolarisation und über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese Rezeptoren spielen in Neurotransmission und Muskelkontraktion eine wichtige Rolle (Bean 1992, North and Surprenant 2000). Homomere geklonte Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Ligandenspezifität, d.h. ihrem pharmakologischen Profil und ihrer Desensibilisierungsrate. Bei Koexpression zweier Rezeptoren, vermutlich mit Ausprägung verschiedener Rezeptorheteromeren kommt es zu kombinierten Effekten in Desensibilisierungsrate und Ligandenspezifität. Tabelle 1 (modifiziert nach North and Surprenant 2000, Khakh et al. 2001) soll dazu eine Übersicht geben.

In vivo vorgenommene Messungen ergeben jedoch auch abweichende pharmakologische Profile im Vergleich zu den Profilen der geklonten Rezeptoren, welche organspezifisch sind und nur zum Teil durch Koexpression verschiedener Rezeptoren erklärt werden können.

Rezeptor	Desensibilisierung durch Agonist	Agonistenprofil
P2X ₁	Schnell	2MeSATP \geq ATP > α,β -Me-ATP >> ADP > β,γ -Me-ATP; GTP ohne Wirkung
P2X ₂	Langsam	ATP = ATP γ S = 2MeSATP; $\alpha\beta$ - und β,γ -Me-ATP ohne Wirkung
P2X ₃	Schnell	2MeSATP >> ATP \geq α,β -Me-ATP
P2X ₄	Langsam	ATP = 2MeSATP; α,β - und β,γ -Me-ATP ohne Wirkung
P2X ₅	Langsam	ATP > 2MeSATP > ADP; α,β - und β,γ -Me-ATP ohne Wirkung, GTP geringe Wirkung
P2X ₆	Langsam	ATP > 2MeSATP > ADP; α,β -Me-ATP ohne Wirkung
P2X ₇	Langsam	BzATP >> 2MeSATP >> ATP > ATP γ S > ADP
P2X ₂ / P2X ₃	Langsam	α,β -Me-ATP mit Wirkung = ATP = 2MeSATP
P2X ₁ / P2X ₅	Langsam	α,β -Me-ATP mit Wirkung < ATP = 2MeSATP > ADP
P2X ₂ / P2X ₆	Langsam	ATP \geq 2MeSATP
P2X ₄ / P2X ₆	Langsam	ATP = 2MeSATP > α,β -Me-ATP

Tab.1: Ligandenspezifität und Desensibilisierungsrate geklonter P2X-Rezeptoren

1.2.2. P2Y-Rezeptoren

Auch P2Y-Rezeptoren finden sich in vielen Geweben von Menschen und Nagern. Sie wurden hauptsächlich in verschiedenen Zellen des Nervensystems, des Gefäßsystems, des Blutes, aber auch in den meisten inneren Organen nachgewiesen. Es handelt sich dabei um 328-538 Aminosäuren lange Proteine mit 7 Transmembrandomänen. Sie werden der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zugerechnet, wobei je nach Rezeptor verschiedene G-Proteine involviert sind. P2Y-Rezeptoren werden abhängig vom Subtyp sowohl durch Purinnukleotide als auch durch Pyrimidinnukleotide aktiviert, in vivo hauptsächlich durch ATP, ADP, UTP und UDP. Auf Grund der Signaltransduktion über ein second-messenger-System erfolgt die Informationsübermittlung langsamer als bei P2X-Rezeptoren.

Es wurden bisher drei unabhängig voneinander ablaufende Signalwege beschrieben. Zum einen führt eine Stimulation dieser Rezeptoren über ein G_q -Protein zu einer Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β), damit zum Anstieg des IP $_3$ -Spiegels und schließlich zur Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration. Dieser Weg ist für alle bisher nachgewiesenen P2Y-Rezeptoren außer P2Y12 gezeigt worden. Zum anderen erfolgt durch den P2Y11-, P2Y13 und den P2Y15-Rezeptor zusätzlich dazu über ein G_s -Protein eine Aktivierung der Adenylatzyklase und damit ein intrazellulärer Anstieg des cAMP-Spiegels. (von Kügelgen and Wetter 2000, Zhang et al. 2000, Inbe et al. 2004). Für P2Y12 und P2Y13 konnte die Hemmung der Adenylatzyklase via eines G_i -Proteins gezeigt werden. Jedoch spielen beim P2Y13-Rezeptor noch weitere Signalwege (s. Tab. 2) eine Rolle (Zhang et al. 2000, Communi et al. 2001). Eine Übersicht über die bisher aus Säuger-DNA geklonten P2Y-Rezeptoren gibt Tabelle 2 (modifiziert nach Ralevic and Burnstock 1998, von Kügelgen and Wetter 2000).

Rezeptor	Agonistenprofil	Signaltransduktion
P2Y1	2MeSADP > 2MeSATP, ADP > ATP (partieller Agonist); keine oder nur geringste Wirkung von UTP/ UDP	1. Aktivierung der PLC \rightarrow IP $_3$ \rightarrow Ca $^{2+}$ \uparrow \rightarrow PKC oder PLA $_2$ oder K $^+$ -Kanäle
P2Y2	ATP = UTP > Ap4A > ATP γ S; keine Wirkung von ADP/ UDP/ α,β -Me-ATP	1. PLC \rightarrow IP $_3$ \rightarrow Ca $^{2+}$ \uparrow b.w.

REZEPTOR	AGONISTENPROFIL	SIGNALTRANSDUKTION
P2Y4	P2Y4 _{human} : UTP > UTP γ S >> ATP (partieller Agonist), UDP P2Y4 _{rat} : ATP = UTP = ITP = Ap4A; ADP, ATP γ S und 2MeSATP equipotent, aber partielle Agonisten; α,β -Me-ATP als Antagonist Rezeptor ist desensibilisierbar	1. PLC \rightarrow IP ₃ \rightarrow Ca ²⁺ \uparrow
P2Y6	UDP; keine oder nur geringe Wirkung von UTP/ ATP/ ADP/ 2MeSATP	1. PLC \rightarrow IP ₃ \rightarrow Ca ²⁺ \uparrow
P2Y11	ATP γ S > BzATP > ATP > 2MeSATP >> ADP; keine Wirkung von UTP/ UDP; α,β -Me-ATP mit Wirkung	1. PLC \rightarrow IP ₃ \rightarrow Ca ²⁺ \uparrow 2. Aktivierung der Adenylatzyklase \rightarrow cAMP-Spiegel \uparrow
P2Y12	2MeSADP, 2MeSATP > ADP, ADP β S > ATP γ S	1. Hemmung der Adenylatzyklase
P2Y13	ADP, 2MeSADP > ADP β S >> ATP > IDP > UDP	1. Hemmung der Adenylatzyklase (niedrige Agonistenkonz.) 2. Aktivierung der Adenylatzyklase (hohe Agonistenkonz.) 3. PLC \rightarrow IP ₃ \rightarrow Ca ²⁺ \uparrow 4. Aktivierung der MAP-kinasen ERK1 und ERK2
P2Y15	AMP, Adenosin	1. PLC \rightarrow IP ₃ \rightarrow Ca ²⁺ \uparrow 2. Aktivierung der Adenylatzyklase \rightarrow cAMP-Spiegel \uparrow

Tabelle 2: Übersicht über bisher bekannte, in Säugerzellen exprimierte P2Y-Rezeptoren für Purin- und Pyrimidinnukleotide, mit Ligandenprofil und Signaltransduktionsmechanismen

1.3. Purinozeptoren und intrazellulärer Lipidstoffwechsel in Adipozyten

In humanen Adipozyten, aber auch in den Adipozyten von weiteren Säugetieren konnten bisher eine Reihe von stoffwechselrelevanten Effekten nachgewiesen werden, welche über P1- und P2-Rezeptoren vermittelt werden. Am weitesten reicht dabei der Nachweis der durch Adenosin vermittelten Lipolysehemmung zurück, wobei Adenosin über den A₁-Rezeptor und ein G_i-Protein die Adenylatzyklase hemmt (Londos et al. 1978).

Die Wirkung von verschiedenen Adeninnukleotiden und synthetischen P2-Rezeptoragonisten auf die Östrogenbiosynthese in humanen Präadipozyten konnte 1998 von Schmidt gezeigt werden.

Weiterhin existieren Untersuchungen zur spezifischen Membranbindung von Purinnukleotiden in Rattenadipozyten, die das Vorhandensein eines P2Y-Rezeptors in diesem Gewebe nahe legen (Yegutkin and Burnstock 1999).

Auch bei in vitro differenzierten 3T3-L1-Adipozyten konnte eine ATP abhängige Differenzierung, sowie eine Hemmung der Lipolyse dargestellt werden, die unabhängig von einer Stimulation der Adenosin- und Insulinrezeptoren war (Schmidt et al. eingereg.).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ATP und weitere Purinnukleotide stimulierend auf die Liponeogenese in Rattenadipozyten wirken (Schödel et al. 2004).

In den letzten Jahren wurden im Fettgewebe verschiedener Säugespezies einige der für oben genannte Mechanismen verantwortlichen Rezeptoren nachgewiesen.

Ubiquitär im Fettgewebe ließen sich P1-Rezeptoren nachweisen, in reifen Adipozyten fast ausschließlich A₁-Rezeptoren, in Präadipozyten dagegen A_{2B}-Rezeptoren (Vassaux et al. 1993). Neben den von Yegutkin and Burnstock (1999) durchgeführten Ligandenbindungsstudien deuteten auch weitere Arbeiten auf das Vorhandensein von P2-Rezeptoren hin. Die mRNA des P2X₁-Rezeptors war in Ratten- und Mäuseadipozyten stark nachweisbar, in humanen Adipozyten, sowie in den Präadipozyten aller drei Spezies jedoch nur in geringen Mengen vorhanden. Auch der Nachweis des Rezeptorproteins war nur in geringen Umfang möglich (Schmidt mndl.). Das Vorhandensein des P2Y₁-Rezeptors in humanen und Rattenadipozyten, sowie des P2Y₁₁-Rezeptors in humanen Adipozyten ist erst seit Kurzem bekannt (Schmidt mndl.).

2. ZIELSTELLUNG

Ziel der Arbeit war es den Einfluss von ATP und einigen anderen Purinnukleotiden auf die Lipolyseregulation der Ratte zu untersuchen. Besonders von Interesse waren dabei mögliche Interaktionen zwischen den Nukleotiden und den etablierten Regulatoren der Lipolyse, wie Insulin und Katecholaminen. Dazu sollte ein geeignetes enzymatisches Testverfahren zur Messung der Glyzerinmenge für größere Probenmengen im hiesigen Labor etabliert werden.

Um die Wirkung der untersuchten Purinnukleotide relativieren zu können, sollte gezeigt werden in welchen Konzentrationen extrazelluläres ATP natürlicherweise in den verwendeten Adipozytenpräparationen vorhanden ist und wie stabil exogenes ATP in den Experimenten bleibt. Das heißt, es stellte sich die Frage, welche Rolle Ektonukleotidasen bezüglich der Interpretation der Ergebnisse spielen.

3. TIERE, MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Tiere

Männliche Wistar-Ratten im Alter von 30-120 Tagen, mit einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, gefüttert mit Alleinfuttermittel für Ratten (Altromin 1326) und Wasser ad libitum.

3.2. Materialien

3.2.1. Chemikalien

- α,β -Me-ATP (von Sigma)
- ATP (von Roche)
- β,γ -Me-ATP (von Sigma)
- BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V, von Roth)
- CGS 15943 (von Research Biochemicals International)
- Dinonylphthalat (von Merck)

- FMN (Riboflavin-5-monophosphat Natriumsalzdihydrat, HPLC-Qualität, von Fluka-Chemie)
- Gummi arabicum (aus der Akazie, von Sigma)
- Myristinaldehyd (Tetradekanal-Myristinaldehyd, Assay-Qualität, von Fluka-Chemie)
- NAD (freie Säure, Grad I, von Roche)
- NADH (Dinatriumsalz, Grad II, von Roche)
- PEP (Phosphoenolpyruvat Trizyklohexylammoniumsalz, von Roche)
- Raffinose (von Serva)

Alle sonst verwendeten Chemikalien waren von analytischer Qualität.

3.2.2. Enzyme

- ADA (Adenosindeaminase, aus Kälbermilz, 2200 U/ ml, von Sigma)
- Esterase (aus Schweineleber, 3750 U/ ml, von Sigma)
- GAPDH (Glyzerolaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, aus Kaninchenmuskel, 800 U/ ml bei 25 °C, von Roche)
- GPDH (Glyzerol-3-phosphatdehydrogenase, aus Kaninchenmuskel, 340 U/ ml bei 25 °C, von Roche)
- GK (Glyzerokinase, aus Candida mycoderma, 85 U/ ml, von Roche)
- Kollagenase (Typ CLS 1, 208 U/ ml, von Biochrom KG)
- LDH (L-Laktatdehydrogenase, aus Kaninchenmuskel, 2750 U/ ml bei 25 °C, von Roche)
- Lipase (Typ XI, aus Rhizopus arrhizus, 5409,6 U/ ml, von Sigma)
- Luciferase (aus Photobacterium fischeri, 1mg Protein/ ml, von Roche)
- NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (aus Photobacterium fischeri, 20 U/ ml, von Roche)
- PK (Pyruvatkinase, aus Kaninchenmuskel, 2000 U/ ml bei 25 °C, von Roche)
- TIM (Triosephosphatisomerase, aus Kaninchenmuskel, 10000 U/ ml, von Boehringer-Mannheim)

3.2.3. Sonstiges

- ATP-Lite-M Assay Kit (von Packard)

3.2.4. Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer und Lösungen

- SD₀-Medium (50% DMEM/F12 + 50% DMEM mit 17 µM Pantothersäure, 2 µg/ml Transferrin und 1 µM Biotin), pH 7,2
- KRH ohne Glucose (50 mM HEPES, 80 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 6 mM KCl in destilliertem H₂O), pH 7,2

3.3. Gewinnung und Vorbehandlung der Zellen

Die verwendeten Zellen wurden aus dem gonadalen und dem perirenen Fettgewebe männlicher Wistar-Ratten im Alter von 30 bis 120 Tagen gewonnen. Soweit bei den einzelnen Experimenten nicht anders beschrieben, wurde das Gewebe von beiden Lokalisationen zusammen verarbeitet und verwendet, da Voruntersuchungen zeigten, dass bezüglich der Lipolyseregulation keine Unterschiede zwischen den Adipozyten der einzelnen Depots bestanden.

Die Tiere wurden jeweils mit CO₂ getötet und sofort präpariert. Nach Freilegung des gewünschten Fettdepots wurde dieses mittels Pinzette und Schere von den jeweiligen Organpaketen (Hoden, Nieren) getrennt und in isotonischer Kochsalzlösung gewaschen. Dabei wurden größere Gefäße im Fettgewebe entfernt um eine Verunreinigung mit Ektonukleotidasen aus Gefäßendothelzellen möglichst gering zu halten. Danach wurde das Gewebe gewogen und in eine Kollagenaselösung (1mg/ ml Kollagenase und 15 mg/ ml BSA in einem Puffer aus 100 mM HEPES, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂/ 5 mM Glucose in destilliertem H₂O, auf pH 7,4 eingestellt) gegeben. Diese führte zur Verdauung der bindegewebigen Strukturen des Fettgewebes, so dass letztlich die Fettzellen frei vorlagen. In dieser Lösung wurde das Gewebe noch einmal grob mit einer Schere zerkleinert. Es ergab sich, dass 15 ml der oben beschriebenen Kollagenaselösung ausreichten, um die maximal 5 g eingesetztes Fettgewebe bei 37°C in einem Schüttelinkubator im Zeitraum von 20-45 min zu verdauen. Kriterium für die Beendigung des enzymatischen Vorganges war das Vorliegen

einer homogenen Fettzellschicht ohne weitere größere Gewebestücke, sowie möglichst wenig zerstörter Fettzellen (erkennbar an einer Fettschicht oberhalb der Zellen).

Um die Kollagenaselösung und noch unverdaute Gewebereste zu entfernen, wurden die Lösung durch einen Filter (Porengröße 250 μm) filtriert und die Zellen 3x mit 15 ml SD₀-Medium oder KRH-Puffer (glucosefrei, mit 4 mg/ ml BSA) gewaschen.

Sofort im Anschluss erfolgte die Verwendung der Fettzellen in den jeweiligen Experimenten.

3.4. Der photometrische Glyzerinnachweis

Die Quantifizierung von Glyzerin ist als Maß für die Lipolyse in Adipozyten gut geeignet, da diese nicht in der Lage sind, das bei der Triglyzeridspaltung entstehende Glyzerin, im Gegensatz zu den freien Fettsäuren, intrazellulär weiter zu modifizieren (Löffler 1998). Deshalb ist die Menge an vorhandenem Glyzerin im Inkubationsansatz direkt proportional zur Menge der vollständig gespaltenen Triglyzeride.

Der photometrische Glyzerinnachweis wurde zum einen zur Bestimmung der Glyzerinmenge in den Adipozytenpräparationen verwendet und zum anderen leicht abgewandelt zur Quantifizierung der Triglyzeridmenge (und damit der Fettzellmenge) je Ansatz.

Die Messungen erfolgten an einem Spektrophotometer „Uvikon 933“ der Firma Kontron Instruments.

3.4.1. Glyzerinquantifizierung in Adipozytenpräparationen

Die Methode wurde beschrieben von Eggstein und Kuhlmann 1974.

3.4.1.1. Inkubation und Lyse der Zellen

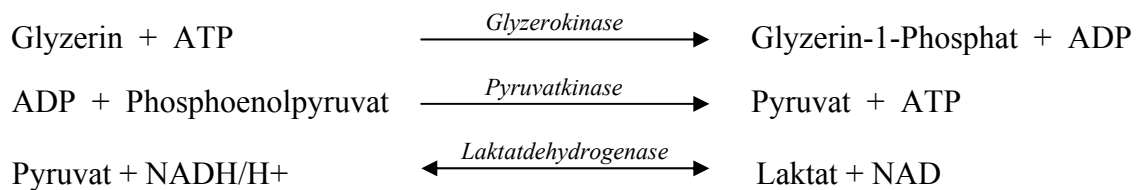
Die gewaschene und filtrierte Zellsuspension wurde mit SD₀-Medium auf 25 – 45 ml (je nach Probenanzahl) verdünnt. Je experimentellem Ansatz (3 ml) wurden in einem 5 ml-Reaktionsgefäß 2 ml der so gewonnenen Verdünnung eingesetzt. Dazu kam 1 ml bzw. 1-x ml SD₀-Medium, wobei x die Menge der zugesetzten und zu testenden Reagenzien war.

Diese Ansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde jeder Ansatz durch Schütteln durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Fettzellen zu gewährleisten, und dann wurden 500 μl dieser Lösung in ein

Eppendorf-Reaktionsgefäß umgefüllt. Diese Probe wurde nun 5 Minuten bei 90°C im Heizblock erhitzt. Hierbei sollten alle Zellen abgetötet bzw. alle Enzyme denaturiert sein. Danach wurden die Proben bei 14000 U/ min zentrifugiert, die Überstände in neue Reaktionsgefäße umpipettiert und bei 4°C aufbewahrt.

3.4.1.2. Glyzerinmessungen am Spektrophotometer

Das Prinzip des Testverfahrens beruht auf folgenden Reaktionen:



NADH/H⁺ absorbiert UV-Licht im Bereich von 340 nm. In einem Photometer kann der Extinktionsabfall bei sinkender NADH/H⁺-Konzentration quantifiziert werden. Die eingesetzte Menge an Glyzerin ist äquivalent zur umgesetzten Menge an NADH/H⁺, und somit proportional zur Extinktionsänderung.

Zur Messung im Photometer wurden jeweils 100 µl der gewonnenen Proben in einer Küvette mit 500 µl Reaktionsgemisch, 300 µl destilliertem H₂O und 100 µl TRAM-Puffer gemischt.

100 ml Reaktionsgemisch setzten sich wie folgt zusammen:

- 85,1 ml TRAM-Puffer (100 mM Triethanolamin in destilliertem H₂O, mit konzentrierter HCl auf pH 7,6 titriert)
- 2 ml MgCl₂-Lösung (0,85 M MgCl₂ in dest. H₂O)
- 4 ml PEP- Stammlösung (50 mM Phosphoenolpyruvat(CHA)₃-Salz in dest.H₂O)
- 4 ml NADH-Stammlösung (20 mM NADH*2Na in 1% NaHCO₃-Lösung)
- 4 ml ATP-Stammlösung (100 mM ATP*2Na*2H*3H₂O in destilliertem H₂O)
- 0,5 ml PK
- 0,4 ml LDH

Die so gefüllten Küvetten wurden nun 5 min lang im Minutentakt im Photometer gemessen. Erst danach wurde die GK als Startenzym der gesamten Reaktion zugegeben. Nun wurde im 2 min-Takt gemessen bis der Extinktionsabfall nahezu stagnierte, um dann noch einmal 3-5 min

im Minutentakt zu messen. Ergebnis waren nun zwei im Idealfall parallele Geraden, deren Δy der gesuchten Extinktionsdifferenz (ΔE) entsprach. Als Beispiel diene die Abbildung 2. Bereits vor Beginn der zu untersuchenden Reaktion kam es zu einem leichten Extinktionsabfall, da das verwendete SD₀-Medium 750 μ M Pyruvat enthielt.

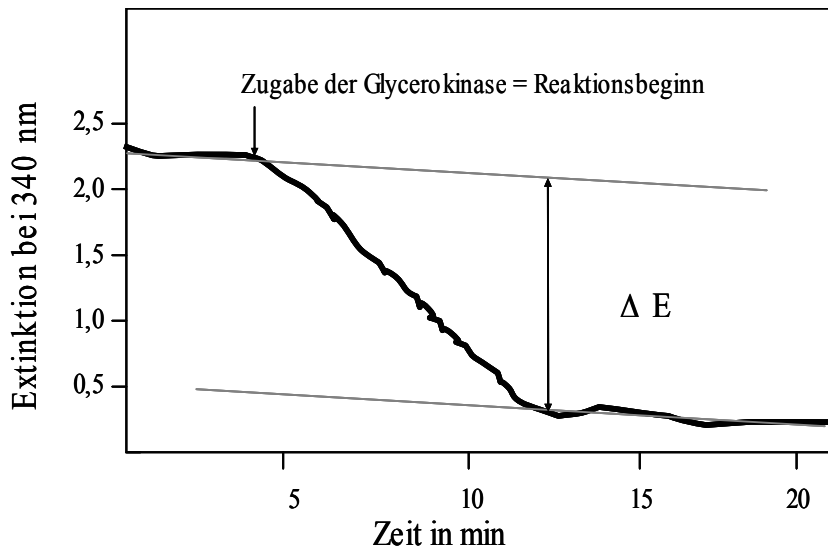


Abb.2: Beispiel für die Bestimmung der Extinktionsänderung während des in 3.4.1 beschriebenen Reaktionsablaufs

Nach Zugabe der Glycero kinase kommt es zu einem von der Glyzerinmenge abhängigen Abfall der NADH/H⁺-Konzentration und damit der Extinktion bei 340 nm.

ΔE ist die Differenz der Extinktionen zu Beginn und zu Ende der Reaktion.

3.4.2. Quantifizierung der Fettzellmenge

Dieser Test ist angelehnt an das von Eggstein und Kuhlmann beschriebene Testverfahren und wurde 1974 von Wahlefeld publiziert.

3.4.2.1. Probenvorbereitung

Die Bestimmung der Fettzellmenge jedes Versuchsansatzes ist notwendig, um die produzierten Glyzerinmengen je Ansatz vergleichen zu können. Deshalb wurde aus jedem Ansatz zu Beginn des Experimentes ein Aliquot (100 μ l) entnommen und eingefroren.

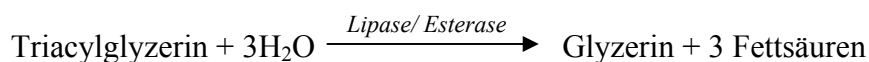
Die Quantifizierung der Glyzerinansätze erfolgte später über die Menge des vorhandenen Triglyzerins in der Probe, da dieses der Zellzahl annähernd proportional sein sollte. Mögliche

Fehlerquellen hierbei sind bereits zu Beginn des Experimentes zerstörte Zellen, sowie intrazellulär bereits vorhandenes Glycerin. Ersteres ist jedoch auch bei anderen Nachweismethoden nicht vermeidbar. Weiterhin sollte eventuell bereits vorhandenes Glycerin durch intensive Waschschrte annähernd quantitativ ausgewaschen worden sein.

Die eingefrorenen Zellsuspensionen wurden aufgetaut und so lange ultraschallbehandelt bis eine Suspension entstanden war (max. 30 s). Zur weiteren Verdünnung wurde eine Gummi-arabicum-Suspension hergestellt (3,5% Gummi arabicum und 6% BSA in KRH ohne Glukose aufgenommen). Danach wurden die Zellproben 1:10 mit Gummi-arabicum-Suspension verdünnt und nochmals ultraschallbehandelt. 50 µl dieser Lösung wurden dann im Test eingesetzt.

3.4.2.2. Messung und Auswertung des Triglyzeridgehaltes

Dem unter 3.4.1.2 beschriebenen Reaktionsablauf wird folgende Reaktion vorangestellt, so dass die Triglyzeride in 3 freie Fettsäuren und letztlich zu messendes Glycerin gespalten werden:



Es werden deshalb zum unter 3.4.1.2. dargestellten Reaktionsgemisch 13,9 µl Esterase und 5µl Lipase (Enzym 1:13,5 mit Ammoniumsulfatpuffer verdünnt) hinzugefügt. Um das Gesamtvolumen des Ansatzes durch Esterase und Lipase nicht zu vergrößern, wurde die zugegebene Menge an Wasser adäquat verringert.

Da pro Mol TG ein Mol Glycerin entsteht, ist auch bei diesem Reaktionsablauf ΔE wieder proportional zur eingesetzten Menge an Triglyzeriden.

3.4.3. Auswertung der photometrischen Daten

Aus den mit Hilfe eines Auswertungsprogramms gewonnenen Extinktionsdifferenzen wurden die Glycerinkonzentrationen mittels der Formel

$$c_{\text{Glycerin}} [\text{mmol/ l}] = \Delta E / (d * \epsilon)$$

errechnet.

Die Triglyzeridkonzentration wurde folgendermaßen bestimmt:

$$c_{\text{Triglyzerid}} [\text{mg/l}] = \frac{\Delta E * M_{\text{Triglyzerid}} * V_K}{\epsilon * d * V_P / \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Dabei war die Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$, der millimolare Extinktionskoeffizient für NADH/H^+ bei 340 nm $\epsilon = 6,3 \text{ l/ (mmol * cm)}$, $M_{\text{Triglyzerid}} = 885,46 \text{ g/ mol}$, V_K (Messansatz je Küvette) = $1000 \text{ }\mu\text{l}$, V_P (eingesetzte Probe) = $50 \text{ }\mu\text{l}$ und der Verdünnungsfaktor (siehe 3.4.2.1) = 10.

Zuletzt wurden die errechneten Glyzerinmengen noch über den gemessenen Triglyzeridgehalt der Ansätze auf ein Milligramm Triglyzerid normiert.

3.5. Der luminometrische Glyzerinnachweis

Der luminometrische Glyzerinnachweis (modifiziert nach Kather et al., 1982 ; Wieland et al., 1985) wurde für eine größere Anzahl Proben im hiesigen Labor etabliert. Es wurden 96-Well-Platten und Multipipetten verwendet, die es ermöglichten bis zu 80 Proben je Platte zeitgleich zu bearbeiten (16 Wells wurden für die mitgeführte Eichkurve benötigt).

3.5.1. Inkubation und Lyse der Zellen

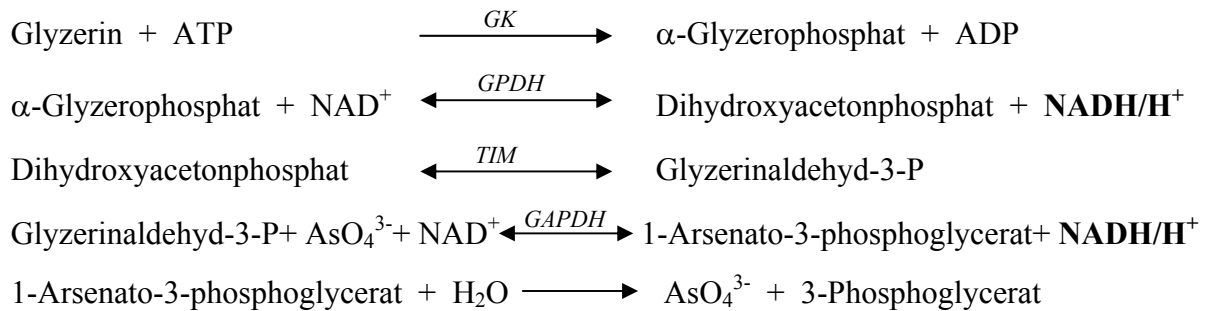
Die Zellsuspension wurde hierbei mit glucosefreiem und mit BSA (4 mg/ ml) versetztem KRH-Puffer gewaschen und im Verhältnis 1:3 verdünnt. Je Versuchsansatz (1 ml) wurde zur einen Hälfte die verdünnte Zellsuspension und zur anderen Hälfte der oben beschriebene KRH-Puffer (abzüglich der zu testenden Reagenzien) verwendet.

Diese Ansätze wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 37°C in einem Thermoschüttelinkubator (niedrigste Geschwindigkeit) inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden je $100 \text{ }\mu\text{l}$ Probe wie unter 3.4.1. entnommen. Nach der Hitzedenaturierung wurden die Proben 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert um so die festen Zellbestandteile vom glyzerinhaltigen Überstand zu trennen. Dieser wurde dann in je ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert.

Die so gewonnenen Proben konnten bei 4°C 1 Woche gelagert werden, wurden aber meist am nächsten Tag weiterverarbeitet.

3.5.2. Inkubation der Proben zur Vorbereitung der Messung am Luminometer

Um die Proben luminometrisch messen zu können, erfolgte vorweg eine Umwandlung des Glycerins, so dass im Laufe der Reaktionsschritte eine proportionale Menge an NADH/H⁺ entstand. Dabei liefen folgende Reaktionen ab:



Die Proben wurden dazu noch einmal im Verhältnis 1:10 mit destilliertem H₂O verdünnt.

Dann wurden je 10 µl der Verdünnung mit 20 µl Inkubationslösung versetzt und diese Gemische in 96-Well-PCR-Platten abgedeckt im Schüttelwasserbad 2 Stunden bei 37°C inkubiert. 9 ml der hierzu verwendeten Inkubationslösung setzten sich wie folgt zusammen:

- 4 ml Reaktionsgemisch (8 g TRAM/ 22 mg K₂PO₄/ 26 mg Dithiothreitol/ 986 mg NaHAsO₄/ 8 mg MgCl₂ in 100 ml dest. H₂O auf pH 9 eingestellt)
- 4 ml ATP/ NAD⁺- Lösung (175 mg ATP + 1000 mg NAD in 100 ml dest. H₂O)
- 1 ml Reaktionsgemisch + der feste Unterstand folgender Enzyme nach 5 min Zentrifugation bei 10000 U/ min:
 - 125 µl GK
 - 125 µl GAPDH
 - 50 µl GDH
 - 2,5 µl TIM

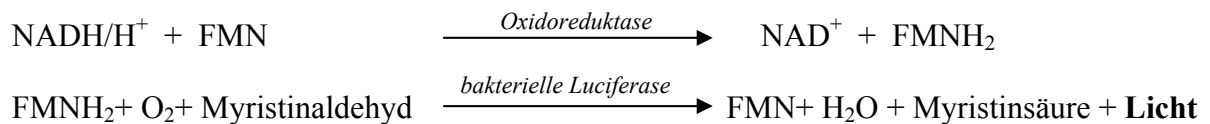
Danach wurden je Probe 200 µl destilliertes H₂O zugegeben. Die so gewonnenen Verdünnungen wurden bis zur Messung auf Eis gelagert.

Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben, wurde bei jeder Messung eine Eichkurve mitgeführt. Es wurden Glycerinstandards von 1; 3,16; 10; 31,62; 100; 316,2 und 1000 µM, sowie ein Leerwert nur mit Wasser und Reaktionsgemisch mit inkubiert.

3.5.3. Die Glyzerinmessung am Luminometer

Die Messung erfolgte an einem „Mikrolumat LB96P“ der Firma EG&G BERTHOLD.

Im Luminometer wird das Licht quantifiziert, welches bei der Umsetzung des im vorherigen Schritt gewonnenen NADH/H⁺ entsteht. Im Einzelnen laufen folgende Reaktionen ab:



Vor Beginn der Messung muss das Luciferase und Oxidoreduktase enthaltende Reaktionsgemisch frisch hergestellt werden. Da je Probe 200 µl des Reaktionsgemisches benötigt werden, der Injektor im Luminometer aber nur 50 µl pro well injizieren konnte wurde das Reaktionsgemisch in zwei Teile geteilt. Dabei enthielt der Anteil im Injektor (1/4) sämtliche Enzyme. Der zweite Teil (3/4) wurde direkt in 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert.

Für ca. 200 Proben ist folgendes Gemisch notwendig:

- Injektoranteil:
 - 5,2 ml Luciferase-Puffer
 - 5 ml Myristinaldehydlösung
 - 0,5 ml FMN-Lösung
 - 1 ml Luciferaselösung
 - 0,23 ml Oxidoreduktaselösung
- Anteil für die Mikrotiterplatte:
 - 19,8 ml Luciferase-Puffer
 - 16 ml destilliertes H₂O

Die Lösungen und Puffer setzen sich wie folgt zusammen:

- Luciferase-Puffer: 45,65 g/ l K₂HPO₄*3H₂O, 0,06 g/ l Dithiothreitol, 40 g/ l Raffinose in dest. H₂O, mit konzentrierter HCl auf pH 7 eingestellt
- Myristinaldehydlösung: 50 g/ l BSA, 10 ml/ l Triton X-100 in destilliertem H₂O mit 2 M KOH auf pH 7 einstellen, 1 g/ l Myristinaldehyd (bei 80°C verflüssigen) zugeben
- FMN-Lösung: 4,56 g/ l K₂HPO₄ in dest. H₂O, mit konzentrierter HCl auf pH 7 titriert, jeweils frisch 0,05 g/ l FMN dazugeben

- Luciferaselösung: 2 mg Luciferase (aus *Photobacterium fischeri*) in 10 ml Luciferase-Puffer lösen
- Oxidoreduktaselösung: 20 U Oxidoreduktase (aus *Photobacterium fischeri*) in 6 ml Luciferase-Puffer lösen

Sobald das Luciferase-Gemisch fertig gestellt ist, muss es 1,5 Stunden im Dunkeln auf Eis gelagert werden. Nach dieser Zeit werden je 50 μl der auf Eis gelagerten NADH/H^+ -Verdünnungen zu dem Anteil Reaktionsgemisch (150 μl) auf der Mikrotiterplatte pipettiert, der Injektor im Luminometer mit dem Injektoranteil gefüllt und die Platte vermessen (Messzeit 0,5 s je Well). Nach einem ersten Durchgang, in welchem die Leerwerte der einzelnen Wells gemessen werden, wird im zweiten Durchgang das enzymhaltige Reaktionsgemisch injiziert. Danach wird die Platte noch so oft gemessen, bis das Maximum an Lumineszenz sicher überschritten und die Reaktion damit nahezu beendet ist.

3.5.4. Auswertung der luminometrischen Daten

Die Maximalwerte an Lumineszenz der einzelnen Wells wurden mit Hilfe eines Auswertungsprogramms an Hand der mitgeführten Eichkurve (Beispiel in Abb.3) in absolute Glycerinwerte umgerechnet. Diese wurden dann später über die Triglyzeridbestimmung der einzelnen Ansätze in relative Werte bezogen auf 1 mg Triglyzerid normiert.

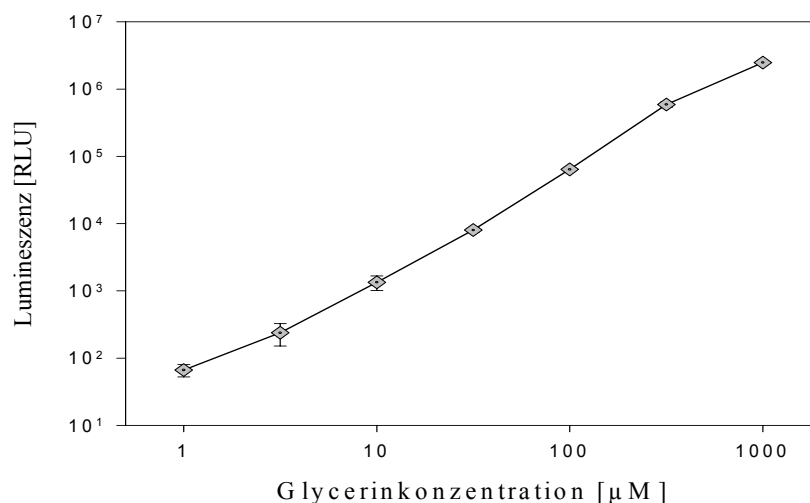


Abb. 3: Glycerineichkurve für luminometrische Glycerinbestimmung

Beispiel für eine Eichkurve, an Hand derer die Glycerinmengen der einzelnen Proben mit Hilfe eines Auswertungsprogramms bestimmt wurden.

3.6. Die Konzentrationsbestimmung von ATP in Adipozytenpräparationen

Die Bestimmung der ATP-Konzentration erfolgte mittels des ATP-Lite-M-Assay-Kits der Firma Packard in einem „Mikrolumat LB96P“ der Firma EG&G BERTHOLD.

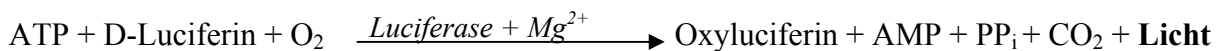
3.6.1. Inkubation und Lyse der Zellen

Die wie unter 3.3 beschrieben gewonnene Zellsuspension wurde für dieses Experiment in KRH-Puffer gewaschen und unverdünnt verwendet.

Die Ansätze à 1 ml wurden bei 37°C im Thermoschüttelinkubator inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden je 200 µl entnommen und in lange schlanke Reaktionsgefäße („Beckmann-Röhrchen“) gefüllt, welche zuvor mit 200 µl Dinonylphthalat gefüllt worden waren. Diese wurden bei 5000 rpm und 4°C 1 min zentrifugiert, wonach das freie ATP im KRH-Puffer von den Zellen getrennt war, die auf der Dinonylphthalatschicht flotierten. Danach wurde das Röhrchen unterhalb der Dinonylphthalat-KRH-Phasengrenze zerschnitten. Der ATP-haltige Unterstand wurde dann in kleine Reaktionsgefäße umpipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.6.2. Messung und Auswertung der Daten

Der ATP-Nachweis dieses Testsystems beruht auf einer luciferasevermittelten Reaktion, bei der ähnlich wie unter 3.4.3. quantifizierbares Licht entsteht. Die Luciferase dieses Testes stammt vom Glühwürmchen (*Photinus pyralis*). Dabei läuft folgende Reaktion ab:



Diese Reaktion wird durch vom Hersteller nicht offengelegte Komponenten des Testsystems derart modifiziert, dass die Lichtemission in Form einer lange Zeit stabilen „glow Lumineszenz“ erfolgt. Nach dem Auftauen der Proben wurden 100 µl je Probe in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und je 50 µl der zum Testsystem gehörenden „mammalian cell lysis solution“ hinzugefügt. Diese hatte eigentlich die Funktion, die vorhandenen Zellen zu zerstören, die endogenen ATPasen zu inaktivieren und damit die Konzentration des vorhandenen ATP relativ konstant zu halten. Im hier beschriebenen Experiment war sie aber nur zur Wahrung der Volumenverhältnisse notwendig, da die Zellen ja schon vorher

abgetrennt worden waren. Die Platte wurde dazu bei 700 rpm 2 min lang geschüttelt. Zusätzlich zu den Proben wurden dabei Triplettwerte einer Eichkurve von 0 – 100 μM ATP (steigend in Zehnerpotenzen, siehe Abb.4) mitgeführt. Daraufhin wurden zu den Proben und Eichwerten je 50 μl einer Luciferase und Luciferin enthaltenden „substrate solution“ dazugegeben, und noch einmal 1 min bei 700 rpm geschüttelt. Anschließend wurde alles 10 min dunkel gestellt und dann im Luminometer gemessen (0,5 sec je Well). Danach erfolgte die Auswertung der Daten mittels des Programms aus 3.5.4. „Substrat solution“ und „mammalian cell lysis solution“ sind Teile des Assay-Kits.

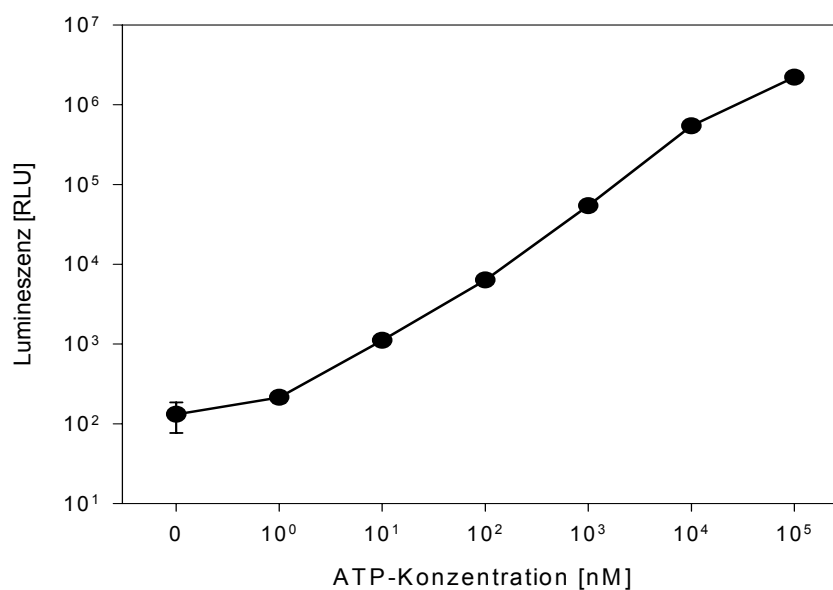


Abb. 4: Eichkurve zur luminometrischen Bestimmung der ATP-Konzentration.

Beispiel für eine Eichkurve, an Hand derer die ATP-Konzentration der einzelnen Proben mit Hilfe eines Auswerteprogramms bestimmt wurden.

3.7. Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Sigma-Stat 2.0 der Firma SPSS Inc. Es wurde Students t-Test zum Vergleich zweier Gruppen angewendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Vergleichsanalyse (ANOVA) mit dem Student-Newman-Keul-Test durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Extrazelluläres ATP in Adipozytenpräparationen – Konzentration und Halbwertszeit

An Hand dieses Experimentes sollte gezeigt werden, in welcher Konzentration extrazelluläres ATP in Adipozytenpräparationen vorkommt, welche auf die gleiche Art wie in den später durchgeführten Experimenten gewonnen wurden. Auch der Abbau von experimentell zugegebenem ATP in verschiedenen Konzentrationen war dabei von Interesse. Folgende Ergebnisse wurden gefunden (siehe Abb. 5):

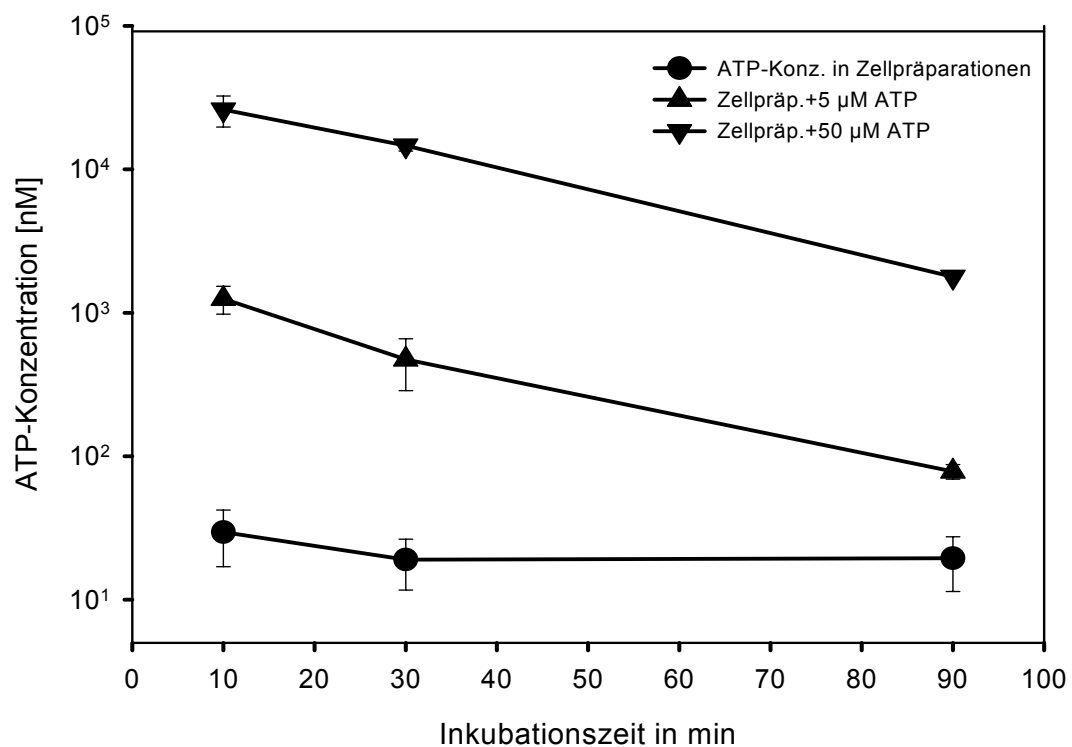


Abb.5 : Die extrazelluläre ATP-Konzentration

Die Daten zeigen den Verlauf der extrazellulären ATP-Konzentration in Adipozytenpräparationen aus dem gonadalen und perirenal Fettgewebe männlicher 110 Tage alter Wistar-Ratten über einen Zeitraum von 90 min.

Folgende Ansätze wurden untersucht: reine Zellpräparationen und Adipozyten mit Zusatz von 5 und 50 µM ATP zu Inkubationsbeginn.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 Experimenten (für 5 µM ATP nur 2 Experimente) mit jeweils 3 getrennten Inkubationsansätzen je Datenpunkt.

Die extrazelluläre ATP-Konzentration in den untersuchten Adipozytenpräparationen beträgt im Durchschnitt etwa 20-30 nM ATP und sinkt auch im Inkubationszeitraum über 90 min nicht wesentlich ab.

Die Regressionsanalyse der Abnahme der ATP-Konzentration ergab Halbwertszeiten von 20 min für 50 μ M und 16 min für 5 μ M zugesetztes ATP.

Die in den weiteren Versuchen (siehe 4.2) eingesetzte Konzentration von 50 μ M ATP sinkt im Verlauf von 90 min nicht unter 1 μ M ab.

4.2. β,γ -Me-ATP hemmt die basale, nicht durch Adenosin suppressierte Lipolyse

Mit Hilfe dieser Experimente sollte dargestellt werden, ob ATP und andere Purinnukleotide an der Regulation der basalen Lipolyse beteiligt sind. Dazu wurde zuerst die unter 3.2.1 beschriebene Methode zum Nachweis der freigesetzten Glyzerinmenge mit Adipozyten aus dem gonadalen und perirenenalen Fettgewebe 30 – 40 Tage alter Ratten verwendet. Auf Grund ihrer zu geringen Empfindlichkeit ließen sich mit dieser Methode keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen. Deshalb wurde ein luminometrisches Nachweisverfahren für Glyzerin (siehe 3.3) im Labor etabliert. Der Vorteil dieser Methode bestand in ihrer Eignung für größere Probenzahlen und ihrer höheren Empfindlichkeit. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1 - 2,5 μ mol/ l (Kather et al. 1982). In den hier angefallenen Messansätzen betrug die Glyzerinkonzentration 0 – 170 μ mol/ l, wobei sich die nach 15 – 30 min gemessenen, noch nicht auf die Triglyzeridmenge normierten Werte, oft im Bereich < 10 μ mol/ l befanden.

Für die Messungen wurden Adipozyten aus gonadalen und perirenenalen Fettdepots männlicher 120 Tage alter Wistar-Ratten inkubiert. Der Zusatz des Adenosinrezeptorantagonisten CGS 15943 diente dem Ausschluss des hemmenden Effektes vorhandenen oder durch ATP-Abbau entstehenden Adenosins auf die Lipolyse und damit auch der Abgrenzung des antilipolytischen Effektes von Adenosin gegenüber einem möglichen Effekt der Purinnukleotide. Insulin wurde sowohl als Hemmstoff der basalen, als auch der katecholaminstimulierten Lipolyse beschrieben (Londos et al. 1984, Stralfors and Honnor 1989) und wurde in einer Konzentration von 10 nM als Kontrolle verwendet.

Die maximal erreichbare Glyzerinfreisetzung als Maß für die Lipolyse in den verwendeten nicht vorstimulierten Präparationen war im Untersuchungszeitraum von 120 min immer < 10 nmol/ mg Triglyzerid.

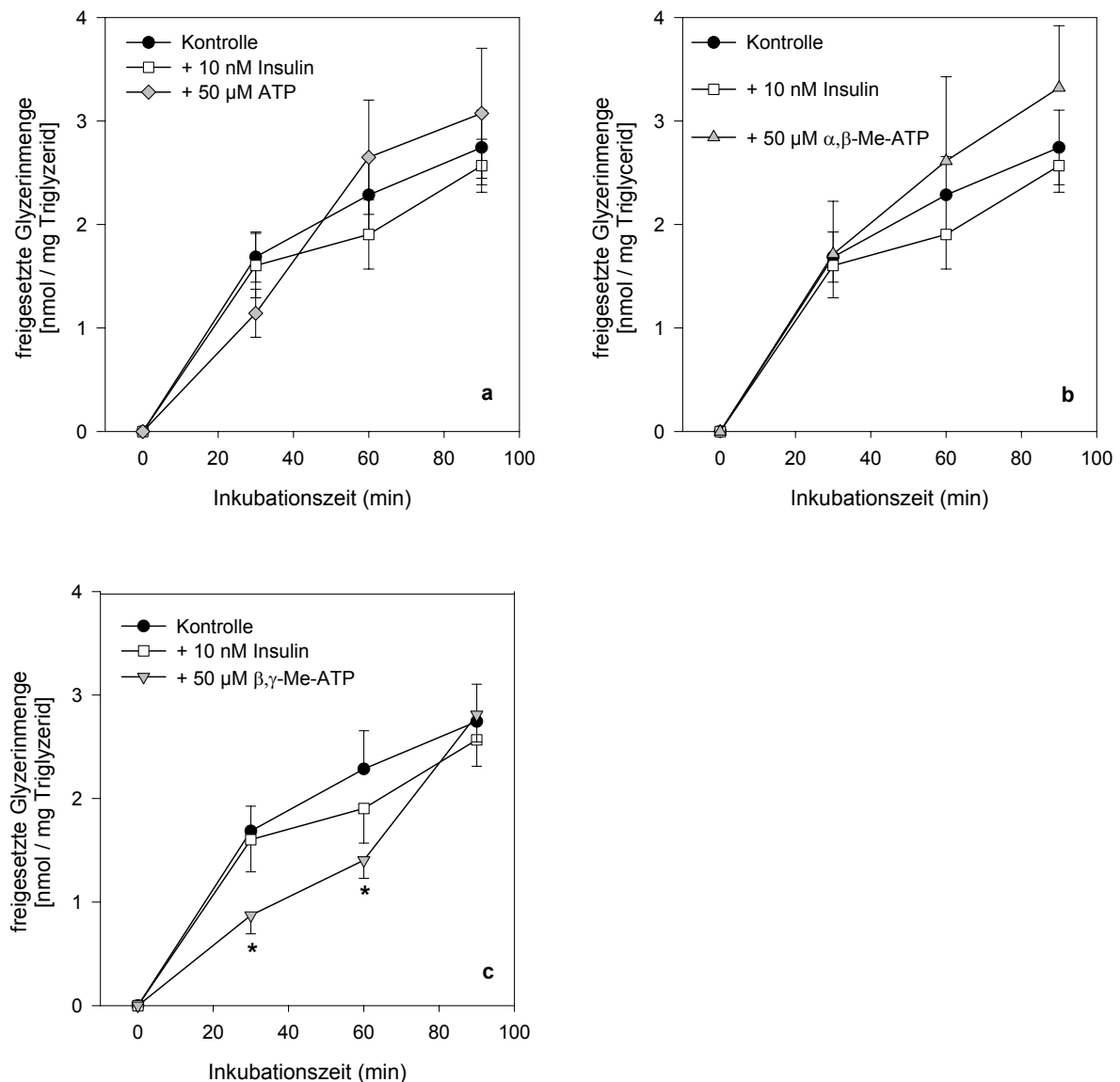


Abb. 6a-c: Nur β,γ-Me-ATP zeigt einen modulierenden Einfluss auf die basale Lipolyse

Gezeigt wird die Wirkung von je 50 μM ATP (a) und seinen α,β- und β,γ-Methylen-substituierten Analoga (b und c) im Vergleich zu 10 nM Insulin (a-c) auf die Lipolyserate unstimulierter Adipozyten. Die Zellen stammten aus dem gonadalen und perirenenalen Fettgewebe 120 +/- 3 Tage alter männlicher Wistar-Ratten und erhielten zeitgleich mit den zu untersuchenden Substanzen den Adenosinrezeptorantagonisten CGS 15943 (200 nM).

Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Experimenten (± SEM) mit je 4 unabhängigen Inkubationsansätzen. Der Kontrollansatz (nur CGS 15943) und der Insulinansatz sind in Abb. a-c identisch, die Daten der Purinnukleotide wurden der Übersichtlichkeit halber getrennt dargestellt.

* zeigt signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$) zum zugehörigen Kontrollansatz ohne Agonisten.

Bei diesen nur mit dem Adenosinrezeptorantagonisten CGS 15943 vorbehandelten Zellen hatte Insulin keinen erkennbaren Einfluss. Auch eine Modifikation durch je 50 μM ATP oder α,β -Me-ATP an diesen Zellen war nicht erkennbar. Sämtliche in diesen Ansätzen gemessenen Lipolyseraten waren damit nicht von der basalen Lipolyse zu unterscheiden (Abb. 6 a, b).

Dagegen zeigte β,γ -Me-ATP (ebenfalls 50 μM) einen modulierenden Einfluss (Abb. 6 c). Es ist eine hemmende Wirkung auf die betreffenden Zellpräparationen in den ersten 60 min Inkubationszeit erkennbar. So betrug die Lipolyserate nach 30 min nur ca. 50% des Kontrollansatzes. Nach 60 min betrug sie 60% des Kontrollwertes und war damit noch immer signifikant niedriger. Nach 90 min ist jedoch die Lipolyserate identisch mit der des Kontrollansatzes und unterscheidet sich im weiteren Verlauf nicht mehr signifikant von diesem.

Untersuchungen an Adipozyten 30 Tage alter männlicher Wistar-Ratten ließen ebensolche geringen basalen Lipolyseraten erkennen wie bei den alten Tieren (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde hier auf weitere Experimente verzichtet.

4.3. Der Einfluss von ATP, α,β -Me-ATP und β,γ -Me-ATP auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse

Nachdem für β,γ -Me-ATP eine Einflussnahme auf die basale Lipolyse dargestellt werden konnte, wurde untersucht, ob eine durch Purinnukleotide vermittelte Modulation der Lipolyserate erreicht werden könnte, wenn die Adipozyten zeitgleich zu je 50 μM der Purinnukleotide mit 10 μM des β -Rezeptoragonisten Isoproterenol stimuliert werden.

Bei diesen Versuchen wurde das gonadale und perirenale Fettgewebe 30-40 Tage alter männlicher Wistar-Ratten verwendet. Insulin diente bei diesem Versuch zum einen als Kontrolle des Testverfahrens, da hierbei eine signifikante Lipolysehemmung erkennbar sein musste (Butcher et al. 1966, Londos et al. 1984), und zum anderen auch als Vergleichswert für die Ansätze mit den Purinnukleotiden.

4.3.1. α,β -Me-ATP verstärkt die durch Isoproterenol stimulierte Lipolyse in Adipozyten

Durch die zeitgleiche Inkubation mit Isoproterenol zeigte sich eine ca. um den Faktor 7-8 erhöhte Lipolyserate im Vergleich zu unstimulierten Adipozyten (siehe Abb. 7). Dabei war der in der Literatur beschriebene antilipolytische Effekt des Insulins auf die katecholaminstimulierte Lipolyse gut reproduzierbar. Die Werte sanken signifikant im Inkubationszeitraum von einer Stunde auf ca. 60% des Kontrollwertes ab. Für α,β -Me-ATP wurde ein stimulierender Effekt auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse gefunden.

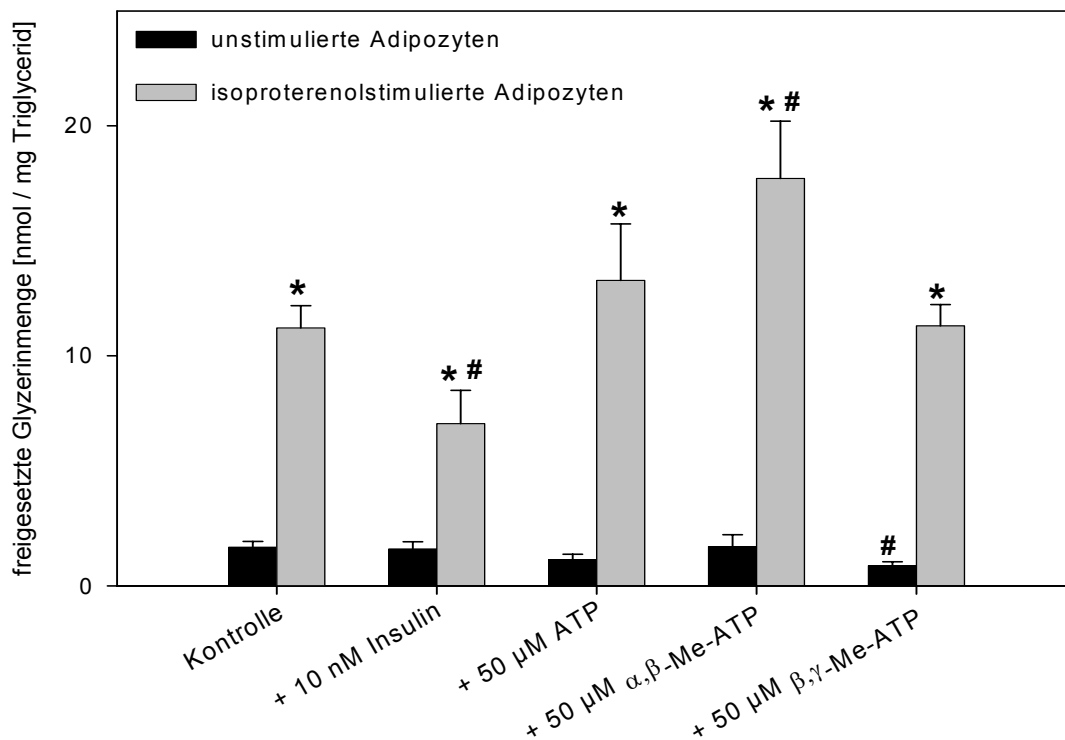


Abb. 7: Isoproterenol stimuliert die Lipolyse in Adipozyten signifikant

Gezeigt wird der Vergleich der Lipolyserate von Adipozyten männlicher Wistar-Ratten nach 30 min Inkubation ohne und mit Stimulation durch 10 μ M Isoproterenol.

Alle Ansätze erhielten zeitgleich 200 nM CGS 15943 zur Blockade der Adenosinrezeptoren.

Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) der Ergebnisse von 6 verschiedenen Adipozytenpräparationen.

* zeigt signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen unstimulierten und isoproterenol-stimulierten Adipozytenpräparationen.

zeigt signifikante Unterschiede zum jeweiligen dazugehörigen Kontrollansatz.

Zeitverlaufsexperimente mit Adipozytenpräparationen 30 – 34 Tage alter männlicher Wistar-Ratten erbrachten folgende Resultate (Abb. 8):

Es ist zu erkennen, dass die Werte der mit ATP inkubierten Zellen zwar tendenziell über den Kontrollwerten liegen (im Mittel 18%, 38% und 30% nach 30, 45 und 60 min), auf Grund der starken Streubreite der Daten ist jedoch keine signifikante Aussage zu erzielen (Abb. 8a).

Dieser Effekt ist bei α,β -Me-ATP noch verstärkt, wobei hier signifikante Ergebnisse zu finden waren. Es zeigt sich nach 30 und 60 min Inkubationszeit eine signifikante Erhöhung der Lipolyserate (Abb. 8b). Die Werte im Vergleich zum Kontrollansatz zeigen eine Steigerung von 58% nach 30 min, um 30% nach 45 min und um 45% nach 60 min.

β,γ -Me-ATP, ein weiteres stabiles ATP-Analogon, zeigt dagegen interessanterweise keinen erkennbaren modulierenden Einfluss auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse. Die Werte sind nahezu identisch mit den Kontrollwerten ohne Purinnukleotide (Abb. 8c).

Für alle untersuchten Substanzen lässt sich zeigen, dass nach einer Inkubationszeit von > 60 min die Streubreite der Werte stark zunimmt, so dass für diesen Zeitraum bei dieser Inkubationsmethode keine sicheren Aussagen mehr möglich sind (Daten nicht gezeigt).

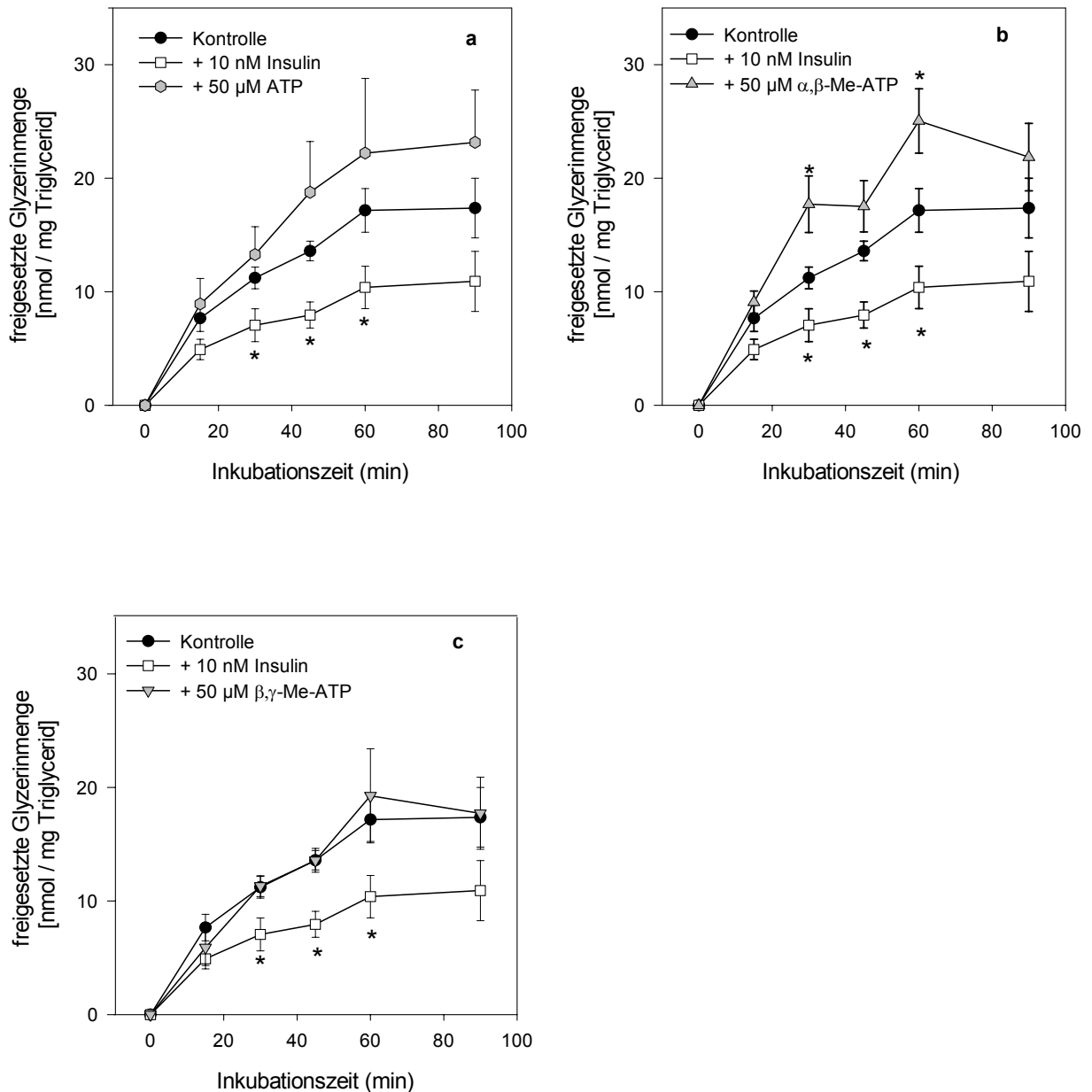


Abb. 8: α,β -Me-ATP verstärkt die isoproterenolstimulierte Lipolyse in Adipozyten

Gezeigt wird der Einfluss von je 50 µM ATP (a) und seinen α,β - und β,γ -Methylen-substituierten Derivaten (b und c) auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse gemischter Adipozytenpräparationen (gonadal und perirenal) männlicher 30 – 34 Tage alter Wistar-Ratten.

Alle Ansätze erhielten zeitgleich mit den Purinnukleotiden Isoproterenol (10 µM) und den Adenosinrezeptorantagonisten CGS 15943 (200 nM).

Als Vergleichswerte dienen der Kontrollansatz (nur 200 nM CGS 15943) und der Insulinansatz (10 nM Insulin + 200 nM CGS 15943), die in Abb. a-c identisch sind und ebenfalls 10 µM Isoproterenol enthielten.

Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) der Ergebnisse von 6 verschiedenen Adipozytenpräparationen.

* zeigt signifikante Unterschiede zum jeweiligen Kontrollwert (t-Test, $p < 0,05$).

4.3.2. ATP und β,γ -Me-ATP verstärken die durch Insulin vermittelte Hemmung der isoproterenolstimulierten Lipolyse in Adipozyten

Die Kombination der Purinnukleotide mit Insulin in einem Ansatz sollte klären, ob sich Effekte der Einzelstimulationen addieren und ob sich daraus Erkenntnisse über den Signalweg innerhalb der Zellen ergeben würden.

Es zeigten sich bei den Kontrollwerten und bei durch Insulin stimulierten Zellen (10 nM Insulin) analoge Ergebnisse wie unter 4.3.1. Die Lipolyserate sank in Gegenwart von Insulin auf ca. 50% (nach 30 und 120 min), bzw. auf 40% (nach 60 min) des Kontrollwertes (Abb. 9). Bei der zeitgleichen Inkubation von Insulin und ATP im Zellansatz (Abb. 9a) kam es nach 30 und 60 Minuten zu einer weiteren signifikanten Absenkung der Lipolyserate im Vergleich zu Insulin allein auf 23% des Kontrollwertes. Nach 120 min betrug die Lipolyse 32% des Kontrollwertes, war wegen der Streubreite der Daten jedoch nicht mehr als signifikant unterscheidbar vom Insulinwert zu betrachten.

Der in 4.3.1. beschriebene lipolysesteigernde Effekt von α,β -Me-ATP auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse ist in Kombination mit Insulin nicht mehr vorhanden. Die Daten beider Zellpräparationen sind nahezu identisch (Abb. 9b).

β,γ -Me-ATP zeigt in Kombination mit Insulin erneut eine zu α,β -Me-ATP gegensätzliche Tendenz auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse, wirkt hierbei jedoch äquivalent zu ATP. Die Lipolyserate betrug nur 25 – 35% des Kontrollansatzes, wobei nach 30 und 60 min die Werte signifikant unter den in Gegenwart von Insulin allein gemessenen Werten lagen (Abb. 9c).

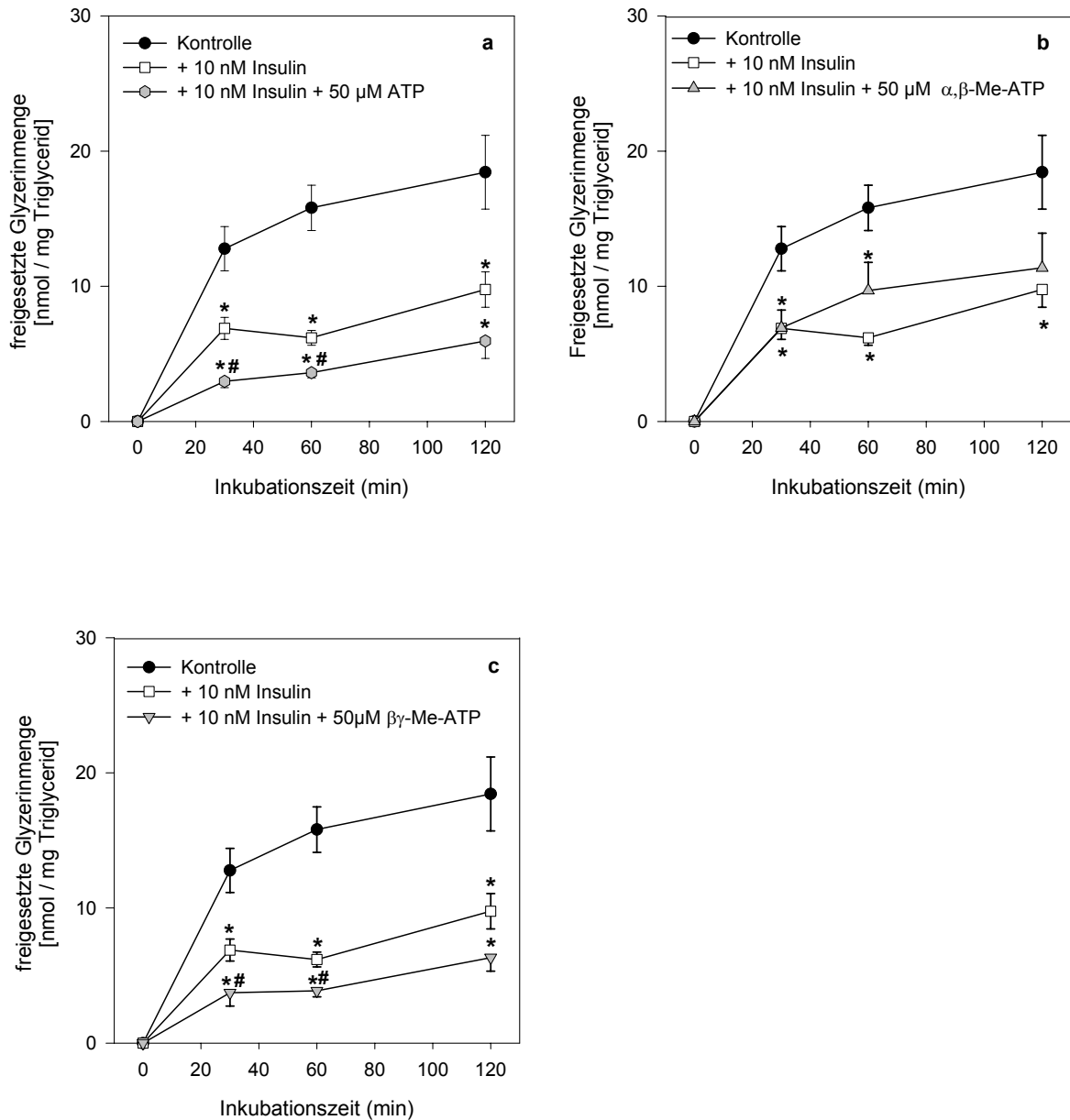


Abb. 9 a-c: ATP und β,γ -Me-ATP verstärken die hemmende Wirkung des Insulins auf die isoproterenolstimulierte Lipolyse in Adipozyten

Gezeigt wird der Einfluss einer Kombination von Insulin (10 nM) und ATP, α,β -Me-ATP oder β,γ -Me-ATP (je 50 μ M) auf die Lipolyse männlicher 34-45 Tage alter Wistar-Ratten.

Alle Zellpräparationen erhielten zusammen mit den anderen Substanzen CGS 15943 (200 nM) und Isoproterenol (10 μ M).

Als Vergleich dienten ein Kontrollansatz (nur mit Isoproterenol und CGS 15943) und ein Ansatz mit Insulin (10 nM), CGS 15943 und Isoproterenol. Diese Werte sind in allen Abbildungen identisch, während die Daten der Purinnukleotide der Übersichtlichkeit halber getrennt dargestellt wurden.

Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) von 3 Adipozytenpräparationen mit jeweils Doppelansätzen.

* zeigt signifikante Abweichungen zum dazugehörigen Kontrollwert (t-Test, $p < 0,05$).

zeigt signifikante Unterschiede zum dazugehörigen Insulinwert (t-Test, $p < 0,05$).

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Purinnukleotide wie ATP sind wichtige Botenstoffe im Organismus von Säugetieren. Ihr Einfluss auf den Zellmetabolismus wird über P2-Rezeptoren vermittelt.

In vivo beträgt die Halbwertszeit für ATP im Blutkreislauf weniger als 0,2 s. Im Blutplasma findet es sich nur in geringsten Mengen und unterliegt einem schnellen Abbau. Diese schnelle Metabolisierung ist bedingt durch Ektonukleotidasen und Ektokinasen auf der Oberfläche von Endothelzellen im Gefäßsystem, aber auch auf anderen Zellen. In vielen Geweben übernehmen ATP und andere Nukleotide aber eine parakrine Signalfunktion. Die zytosolische ATP-Konzentration der meisten Zellen liegt im millimolaren Bereich (3 – 5 mM) und ist eine der Hauptressourcen für extrazelluläres ATP (Gordon 1986, Dubyak and El-Moatassim 1993). ATP wird hierbei durch Zellyse frei, oder über Plasmamembranporen unter bestimmten Bedingungen wie z.B. Hypoxämie freigesetzt. Beschrieben ist diese Art der Freisetzung für diverse Blutzellen (Gordon 1986, Ellesworth et al. 1995), Mastzellen (Osipchuk and Cahalan 1992), Herzmuskelzellen (Forrester 1990), Fibroblasten (Grierson and Meldolesi 1995) und andere mehr. Ein weiterer Herkunftsort extrazellulären ATPs ist das Nervensystem, wo ATP als ein Kotransmitter zu Noradrenalin und Acetylcholin gezeigt werden konnte (Westfall et al. 1990). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass ATP nicht „nur“ als Kotransmitter wirkt, sondern auch entscheidendes Signalmolekül sein kann. Mulryan et al. zeigten 2000, dass der Funktionsverlust des P2X1-Rezeptorgens zu Infertilität bei männlichen Mäusen führt, da die sympathisch vermittelte Kontraktion des Vas deferens zwingend abhängig von einer P2X1-Rezeptoraktivierung durch ATP war.

Es war für die untersuchte Fragestellung dieser Arbeit daher wichtig, Erkenntnisse über die natürliche ATP-Konzentration und die ATP-Metabolisierung in den verwendeten Fettgewebspräparationen zu gewinnen. Um eine Wirkung des ATP an möglichen vorhandenen Purinozeptoren zu erzielen und über einen ca. zwei Stunden umfassenden Untersuchungszeitraum zu messen, war es notwendig die für die bekannten Rezeptoren notwendigen Effektivkonzentrationen über diesen Zeitraum in den Zellansätzen zu erreichen.

Wenn oben angeführte Befunde berücksichtigt werden, erklärt sich die in den vorgestellten Experimenten in gereinigten Adipozytenpräparationen gemessene ATP-Konzentration von 20 – 30 nM am ehesten durch die Lyse eines geringen Teiles der Adipozyten, die in kleinem Umfang unvermeidbar ist. Es lässt sich abschätzen, dass die gefundene ATP-Konzentration bereits aus der Lyse von ca. 1/500 – 1/333 der eingesetzten Adipozyten resultieren könnte. Daher erscheint es als wenig wahrscheinlich, dass ein Mechanismus zur Freisetzung aus noch

intakten Zellen verantwortlich gemacht werden muss. Die gemessene geringe basale Konzentration innerhalb der untersuchten Zellpräparationen *in vitro* lässt eine Beeinflussung der in den weiteren Experimenten erzielten Ergebnisse unwahrscheinlich erscheinen.

Die relative Konstanz der endogenen ATP-Konzentration über 90 min sowie auch die gemessene Halbwertszeit von etwa 20 min bei 50 μM zugesetztem ATP spricht für nur noch geringe Ektonukleotidaseaktivität in der Zellpräparation. Sie ist ähnlich der Halbwertszeit für ATP in *ex vivo* befindlichem Blut, die mit ~ 10 min angegeben wird (Dubyak and El-Moatassim 1993).

Somit kann bei der in den weiteren Experimenten verwendeten Konzentration von 50 μM ATP davon ausgegangen werden, dass über einen Zeitraum von 90 min die ATP-Konzentration in einem Bereich liegt ($> 1 \mu\text{M}$) der mindestens der EC_{50} an allen bisher beschriebenen P2-Rezeptoren entspricht, die als ATP-sensibel eingeordnet werden (Khakh et al. 2001). Es ist damit als sicher anzunehmen, dass unter Verwendung von 50 μM ATP zu Inkubationsbeginn eine ausreichende Konzentration von ATP im Inkubationsansatz in dem untersuchten Zeitbereich zur Verfügung steht.

Die Bedeutung von Purinnukleotiden für die Regulation des Lipidstoffwechsels ist noch weitgehend ungeklärt. Die Frage nach möglichen Rezeptoren dieser Substanzen im Fettgewebe, sowie die Untersuchung metabolischer Vorgänge mittels verschiedener nicht *in vivo* vorkommender Purinnukleotide stehen daher am Beginn.

Im Fettgewebe des Menschen werden P2X₁-Rezeptoren in geringem Umfang in Präadipozyten und in Adipozyten exprimiert. Bei der Ratte findet sich die Expression dieser Rezeptoren schwach in Präadipozyten, dagegen nimmt ihre Expression in Adipozyten stark zu (Schmidt et al. *eingereicht*). Über weitere vorhandene P2X-Rezeptoren sowie über etwaige P2Y-Rezeptoren lagen bisher keine gesicherten Erkenntnisse vor. Erstmals wurde von Schödel (2003) gezeigt, dass Purinnukleotide einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Regulation des Lipidstoffwechsels in Rattenadipozyten besitzen. Der Nettoeffekt dieser Einflussnahme scheint anaboler Natur zu sein, da sowohl ATP, als auch ADP und AMP die Lipogeneserate bei Unterdrückung der Wirkung von Adenosin steigern und damit ähnlich wie Insulin wirken, bzw. die Insulinwirkung verstärken (Schödel 2003, Schödel et al. 2004).

Der in der hier vorgelegten Arbeit untersuchte katabole, lipolytische Stoffwechselweg weist in dieselbe Richtung. Es zeigt sich, dass ATP allein nicht an der Regulation der basalen Lipolyse beteiligt ist. Gleiches gilt für die isoproterenolinduzierte Lipolyse. Dagegen verstärkt ATP bei durch Isoproterenol vorstimulierten Zellen die Wirkung von Insulin, also

dessen antilipolytischen Effekt. Die Folge davon ist, dass ATP damit ebenfalls einen anabolen Effekt auf den Lipidstoffwechsel ausübt.

Dieser Effekt konnte auch für β,γ -Me-ATP gezeigt werden, welches in Kombination mit Katecholaminen und Insulin äquivalent zu ATP wirkt, allein aber keinen Einfluss auf die isoproterenolinduzierte Lipolyse hat. Diese dem ATP gleichartige Wirkung wurde ebenfalls für die Lipogenese dargestellt (Schödel et al. 2004). Zusätzlich zur oben beschriebenen Wirkung führt β,γ -Me-ATP allein zur Hemmung der basalen Lipolyse über einen Inkubationszeitraum von 60 min, ein Effekt, der für ATP nicht darstellbar war. Auch dieser Effekt hat seine Entsprechung bei der Lipogenese, wo β,γ -Me-ATP die basale Lipogenese signifikant steigert. Möglicherweise ist das stabile ATP-Analogon potenter als ATP am dafür in Frage kommenden Rezeptor. β,γ -Me-ATP wird bisher als spezifisch für P2X1- und P2X3-Rezeptoren angesehen, dies lässt die Wirkung über den in Rattenadipozyten vorhandenen P2X1-Rezeptor naheliegend erscheinen.

Das außerdem in dieser Arbeit untersuchte α,β -Me-ATP zeigt davon abweichende Ergebnisse, da es gegenläufig zu β,γ -Me-ATP wirkt. Auf die basale Lipolyse konnte zwar ebenso wie für ATP kein Einfluss gefunden werden, für gleichzeitig mit Isoproterenol stimulierte Zellen war aber eine Steigerung der Lipolyse um bis zu ca. 60% nachweisbar. Unter diesen Bedingungen verstärkte möglicherweise auch ATP die Lipolyse, jedoch war kein signifikantes Ergebnis zu erhalten. Eine Hemmung der Insulinwirkung durch α,β -Me-ATP konnte bei gleichzeitiger Inkubation mit Insulin jedoch nicht beobachtet werden. Der Insulineffekt wurde durch diesen Agonisten nicht erkennbar modifiziert.

Auch diese Befunde korrelieren mit der Arbeit von Schödel (2003), in welcher bei der Lipogeneseregulation ebenso für α,β -Me-ATP ein gegenläufiges Profil zu ATP und β,γ -Me-ATP dargestellt wird. Tabelle 3 gibt dazu einen vereinfachten Überblick. Mit diesem Hintergrund scheint es angebracht, die Beteiligung eines zweiten P2-Rezeptors an der Regulierung von Lipogenese und Lipolyse in Rattenadipozyten zu postulieren.

	Lipolyse			Lipogenese	
	basal	Isoproterenol-stimuliert	Isoproterenol-stimuliert + Insulin-gehemmt	basal	Insulin-stimuliert
+ ATP	0	(↑)	↓	(↑)*	(↑)*
+ β,γ-MeATP	↓	0	↓	↑	↑
+ α,β-MeATP	0	↑	0	↓	↓

Tab. 3: Übersicht über die Wirkung der Purinnukleotide auf Lipolyse und Liponeogenese in Adipozytenpräparationen männlicher Wistar-Ratten im Alter von 1 Monat (Lipolyse außer Basalwerte) oder ≥ 4 Monaten (Lipogenese und basale Lipolyse)

(↑)* Steigerung abhängig vom Alter der Tiere

(↑) Steigerung fraglich

Eine mögliche Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist die Annahme, dass sowohl ATP als auch β,γ -Me-ATP über den bereits postulierten P2X1-Rezeptor zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führen. Wie Tebar et al. 1996 und Xue et al. 1998 darstellten, kann ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Hemmung der Lipolyse führen.

Diskutiert wurden dabei Mechanismen der Phosphorylierung der HSL in Bereichen, die nicht identisch mit Angriffspunkten der PKA sind (Holm et al. 2000) und damit zu einem Funktionsverlust des Enzyms führen.

Wenn man davon ausgeht, dass β,γ -Me-ATP potenter als ATP am dafür in Frage kommenden Rezeptor ist, wäre dies auch eine Erklärungsmöglichkeit für die Wirkung von β,γ -Me-ATP auf die basale Lipolyse. Es wäre damit auch eine Erklärung für die Verstärkung des Insulineffektes, der hauptsächlich den PKA vermittelten Weg hemmt, gegeben. Hierbei würde dann eine direkte Modulation der HSL bestehen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Aktivierung der Phosphodiesterase 3B (PDE_{3B}) führt, die unabhängig von der Aktivierung durch Insulin ist und dessen Wirkung sogar verstärkt (Xue et al. 2001). Alternativ muss

deshalb für ATP und β,γ -Me-ATP eine kalziumvermittelte Aktivierung der PDE_{3B} in Betracht gezogen werden.

Die Einflussnahme von α,β -Me-ATP auf die Lipolyse könnte durch einen P2Y-Rezeptor vermittelt sein. Seit van der Weyden et al. 2000 darstellten, dass α,β -Me-ATP über einen P2Y₁₁-Rezeptor in einer humanen Leukämiezelllinie gleichartig zu ATP wirkt, kann davon ausgegangen werden, dass α,β -Me-ATP kein selektiver Agonist an P2X-Rezeptoren ist. Bisher konnte in Adipozyten von Ratten jedoch nur der P2Y₁-Rezeptor nachgewiesen werden (Schmidt 2004 mdl.). Für die Möglichkeit der Signalübertragung über einen P2Y-Rezeptor spricht auch, dass für den bisher nur in menschlichen Zellen nachgewiesenen P2Y₁₁-Rezeptor ein zusätzlicher Signaltransduktionsmechanismus beschrieben wurde. Neben der Aktivierung des für alle P2Y-Rezeptoren beschriebenen Weges, der über eine Aktivierung der PLC und eine Erhöhung des IP₃-Spiegels zum Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels führt, was prinzipiell zu ähnlichen Effekten, wie die Aktivierung von P2X-Rezeptoren führen sollte, ist hier eine Aktivierung der Adenylatzyklase beschrieben (von Kügelgen and Wetter 2000).

Damit besteht die Möglichkeit, antagonistische Signalwege zu aktivieren. Dieser Weg wurde mittlerweile auch für die humanen P2Y₁₃- und P2Y₁₅-Rezeptoren gezeigt, jedoch lassen die zugehörigen Agonistenprofile zumindest für P2Y₁₅ eine Beteiligung an der Regulation der Lipolyse unwahrscheinlich erscheinen (Communi et al. 2001, Inbe et al. 2004).

Da die Aktivierung der Adenylatzyklase der Weg ist, über den auch die Katecholamine wirken, stellt sich allerdings die Frage warum dann α,β -Me-ATP allein keinen Einfluss auf die basale Lipolyse hat. Denkbar ist hierbei, dass die Stimulierung der Adenylatzyklase durch α,β -Me-ATP allein nicht ausreicht, um die Aktivität der PDE_{3B} zu antagonisieren und so einen messbaren lipolytischen Effekt sichtbar zu machen. In Gegenwart von Katecholaminen würde dann aber möglicherweise ein überproportionaler Anstieg des cAMP-Spiegels die Aktivität der PDE_{3B} überdecken. Bei einer Kombination von Katecholaminen, Insulin und α,β -Me-ATP würde die Aktivität der PDE_{3B} dann stimulationsbedingt wieder überwiegen, was die Ergebnisse der Kombinationsinkubationen mit Insulin und α,β -Me-ATP erklären könnte.

Ein möglicher weiterer im Wirkprofil abweichender P2X-Rezeptor, der zusätzlich zum P2X₁-Rezeptor exprimiert wird, ist wegen des relativ gleichartigen Signaltransduktionsmechanismus aller P2X-Rezeptoren, mit einer unspezifischen Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels, unwahrscheinlich. Bisher konnte in Rattenadipozyten lediglich der P2X₁-Subtyp detektiert werden, so dass die bereits bekannten P2X-Rezeptoren

dafür nicht in Frage kommen. In humanen Präadipozyten wurde zwar auf Grund des pharmakologischen Profils ein P2X-Rezeptor zusätzlich zum P2X1-Rezeptor postuliert (Schmidt and Löffler 1998), ein Nachweis dafür, ebenso wie für die Expression in Rattenadipozyten, steht bisher jedoch aus.

Eine mögliche Altersabhängigkeit der Expression von verschiedenen P2-Rezeptoren, wie sie die Arbeit von Schödel (2003) nahe legt, kann durch die Untersuchungen zur Lipolyseregulation nicht ausgeschlossen werden. Hier sind für genaue Aussagen weitere Experimente notwendig.

Eine Erweiterung der Abbildung 1 mit den an der Lipolyseregulation beteiligten Vorgängen ist abschließend bildlich in Abbildung 10 dargestellt.

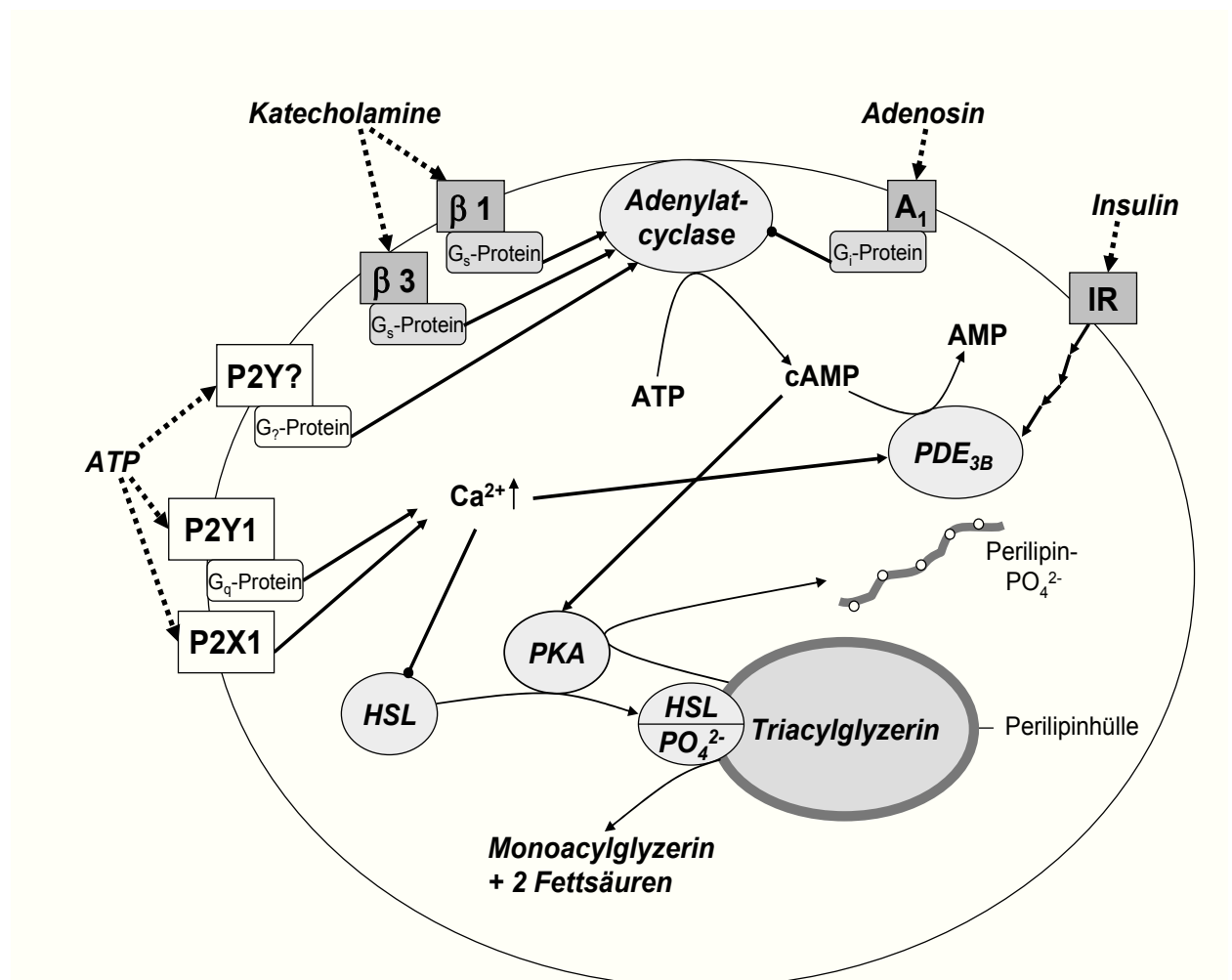


Abb. 10: Lipolytische Signalwege in Adipozyten

A_1 – Adenosin(A_1)-Rezeptor, ATP – Adenosintriphosphat, $\beta 1/\beta 3$ – β -Rezeptoren, HSL – hormonsensitive Lipase, IR – Insulinrezeptor, PDE_{3B} – Phosphodiesterase 3B, PKA – Proteinkinase A, P2X/ P2Y – P2X-/P2Y-Rezeptor

.....> Wirkt am Rezeptor

————> Wird zu

————> Stimuliert

————● Hemmt

Zur Vereinfachung wurden zwischen Rezeptoren und Zielenzymen nicht alle Mediatoren dargestellt.

Perspektivisch sind weitere Untersuchungen zur Identifizierung der an diesen Regulationsvorgängen beteiligten Rezeptoren sinnvoll. Speziell die P2Y-Rezeptorfamilie ist hierbei von Interesse. Die Testung weiterer z. T. rezeptorspezifischer Agonisten und Antagonisten, die Messung des durch die verschiedenen Agonisten induzierten cAMP-Spiegels sowie des Kalziumspiegels sind zum Teil schon in weiteren Arbeiten begonnen worden. Der Nachweis der rezeptorspezifischen mRNA bzw. des Rezeptorproteins eines oder mehrerer weiterer Rezeptoren kann dann zur Sicherung der postulierten Theorien führen.

Literaturverzeichnis

Bean BP (1992) Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels
Trends-Pharmacol-Sci 13: 87 – 90

Benham CD and Tsien RW (1987) A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle
Nature 238: 275 – 278

Butcher RW, Sneyd JG, Park CR and Sutherland EW Jr. (1966) Effect of Insulin on Adenosin 3', 5'-Monophosphate in Rat Epididymal Fat Pad
J-Biol-Chem 241: 1652 – 1653

Communi D, Suarez Gonzalez N, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M and Boeynaems J-M (2001) Identification of a Novel Human ADP Receptor Coupled to G_i
J-Biol-Chem 276: 41479 – 41485

Drury AN and Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart
J-Physiol 68: 213 – 237

Dubyak GR (1991) Signal transduction by P_2 -purinergic receptors for extracellular ATP
Am-J-Respir-Cell-Mol-Biol 4: 295 – 300

Dubyak GR and El-Moatassim C (1993) Signal transduction via P_2 -purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides
Am-J-Physiol C577 – C606

Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC Jr. (1992) Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet
Proc-Natl-Acad-Sci USA 89: 8537 – 8541

Eggstein M and Kuhlmann E: Triglycerides, Determination after Alkaline Hydrolysis. In: Bergmeyer HU (Hrsg.): Methods of Enzymatic Analysis Vol. 4 Verlag Chemie GmbH Weinheim (1974) S.1825 – 1831

Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG and Dietrich HH (1995) The erythrocyte as a regulator of vascular tone
Am-J-Physiol 269: H2155 – H2161

Enoksson S, Degerman E, Hagstrom-Toft E, Large V and Arner P (1998) Various phosphodiesterase subtypes mediate the in vivo antilipolytic effect of insulin on adipose tissue and skeletal muscle in man
Diabetologia 41: 560 - 68

Forrester T (1990) Release of ATP from heart: Presentation of a release model using human erythrocyte
Ann-NY-Acad-Sci 603: 335 – 352

Fotovati A, Hayashi T, Tsuchida N and Ito T (2000) Effects of isoproterenol, a non-selective beta-agonist, on lipid metabolism of rats: In vitro and in vivo study
Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University 45: 99 – 108

Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J and Salvador J (2001) Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes
FASEB-J 15: 333 – 340

Frühbeck G (2004) The adipose tissue as a source of vasoactive factors
Curr-Med-Chem-Cardiovasc-Hematol-Agents 2: 197 - 208

Gordon JL (1986) Extracellular ATP: Effects, sources and fate
Biochem-J 233: 309 – 319

Green Allen (1987) Adenosine Receptor Down-regulation and Insulin Resistance Following Prolonged Incubation of Adipocytes with an A₁ Adenosine Receptor Agonist
J-Biol-Chem 262: 15702 – 15707

Grierson JP and Meldolesi J (1995) Shear stress-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP
J-Biol-Chem 270: 4451 – 4456

Hales C, Lucio P and Siddle K (1978) Hormonal control of adipose-tissue lipolysis
Biochem-Soc-Symp 43: 97 – 137

Holm C, Anthonsen MW, Contreras JA, Fourel D, Karlsson M, Osterlund T, Ntambi JM (2000) Hormone sensitive lipase: structure, function and regulation
Adipocyte biology and hormone signaling 101-110; Biomedical and Health Research Volume 37 S.45 ff.

Inbe H, Watanabe S, Miyawaki M, Tanabe E and Encinas JA (2004) Identification and Characterisation of a Cell-Surface Receptor, P2Y₁₅, for AMP and Adenosin
J-Biol-Chem 279: 19790 – 19799

Kather H, Bieger W, Michel G, Aktories K and Jakobs KH (1985) Human Fat Cell Lipolysis Is Primarily Regulated by Inhibitory Modulators Acting Through Distinct Mechanisms
J-Clin-Invest 76: 1559 – 1565

Kather H, Schroder F and Simon B (1982) Microdetermination of glycerol using bacterial NADH-linked luciferase.
Clin-Chim-Acta 120: 295 – 300

Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M and Humphrey PPA (2001) International Union of Pharmacology, XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X Receptors and Their Subunits
Pharmacol-Rev 53: 107 – 118

Von Kügelgen I and Wetter A (2000) Molecular Pharmacology of P2Y- Receptors
Naunyn-Schmiedeberg's-Arch.-Pharmacol. 362: 310 - 323

Löffler G: Stoffwechsel der Lipide. In: Löffler G und Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1998) S.446 - 450

Londos C, Honnor RC and Dhillon GS (1984) cAMP-dependent Protein Kinase and Lipolysis in Rat Adipocytes

J-Biol-Chem 260: 15139 – 15145

Louis SN, Jackman GP, Nero TL, Iakovidis D and Louis WJ (2000) Role of beta-adrenergic receptor subtypes in lipolysis

Cardiovasc-Drugs-Therapie 14: 565 – 577

Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA and Evans RJ (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors

Nature 403: 86 - 89

Murphy GJ, Kirkham DM, Cawthorne MA and Young P (1993) Correlation of beta 3-adrenoceptor-induced activation of cyclic AMP-dependent protein kinase with activation of lipolysis in rat white adipocytes

Biochem-Pharmacol 46: 575 - 581

North RA and Surprenant A (2000) Pharmacology of Cloned P2X Receptors

Ann-Rev-Pharmacol-Toxicol 40: 563 - 580

Osipchuk Y and Cahalan M (1992) Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells

Nature 359: 241 – 244

Ralevic V and Burnstock G (1998) Receptors for Purines and Pyrimidines

Pharmacol-Rev 50: 413 – 475

Schmidt M and Löffler G (1998) Induction of aromatase activity in human adipose tissue stromal cells by extracellular nucleotides: Evidence for P2-purinoceptors in adipose tissue

Eur-J-Biochem 252: 147 – 154

Schmidt M, Schaubmar A and Löffler G P2-Receptors for extracellular nucleotides in adipose tissue – the role of calcium in aromatase induction

Publikation eingereicht (a)

Schmidt M, Dammeier J, Amon C and Löffler G P2-Receptors for extrazellular nucleotides in adipose tissue - P2X1-receptor expression and role for ATP in regulation of differentiation and lipolysis

Publikation eingereicht (b)

Schödel J (2003) Charakterisierung von zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren im weißen Fettgewebe von Wistar-Ratten

Dissertation zum doctor medicinae an der FSU Jena

Schödel J, Weise I, Klinger R and Schmidt M (2004) Stimulation of lipogenesis in rat adipocytes by ATP, a ligand for P2-receptors

Biochem-Biophys-Res-Comm 321: 767 – 773

Schwabe U, Ebert R and Erbler HC (1975)

Adv-Cyc-Nuk-Res 5: 569 – 584

Stralfors P and Honnor RC (1989) Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent Proteinkinase activity

Eur-J-Biochem 182: 379 – 385

Tebar F, Soley M and Ramirez I (1996) The antilipolytic effects of insulin and epidermal growth factor in rat adipocytes are mediated by different mechanisms

Endocrinology 137: 4181 – 4188

Vassaux G, Gaillard D, Mari B, Ailhaud G and Negrel R (1993) Differential expression of adenosine A1 and A2 receptors in preadipocytes and adipocytes

Biochem-Biophys-Res-Comm 193: 1123 – 1130

Wahlefeld AW: Triglycerides, Determination after Enzymatic Hydrolysis. In: Bergmeyer HU (Hrsg.): Methods of Enzymatic Analysis Vol.4
Verlag Chemie GmbH Weinheim (1974) S.1831 – 1835

Westfall DP, Sedaa KO, Shinozuka K, Bjur RA and Buxton IL (1990) ATP as a cotransmitter
Ann-NY-Acad-Sci 603: 300 – 310

van der Weyden L, Adams DJ, Lutrell BM, Conigrave AD and Morris M (2000)
Pharmacological characterisation of the P2Y₁₁ receptor in stably transfected haematological cell lines
Mol-Cell-Biochem 213: 75 – 81

Wieland E, Fischer B and Kather H (1985) Semiautomatic bioluminescence determination of glycerol using a computer controlled luminescence analyser (Berthold LB 950 T)
J-Clin-Chem-Clin-Biochem 23: 99 – 103

Xue B, Moustaid N, Wilkinson WO and Zemel MB (1998) The agouti gene product inhibits lipolysis in human adipocytes via a Ca²⁺-dependent mechanism
FASEB-J 12: 1391 – 1396

Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB and Zemel MB (2001) Mechanism of intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) inhibition of lipolysis in human adipocytes
FASEB-J 15: 2527 – 2529

Yegutkin GG and Burnstock G (1999) Steady-state binding of adenine nucleotides ATP, ADP and AMP to rat liver and adipose plasma membranes
J-Recept-Signal-Transduct-Res 19: 437 – 448

Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Smith M, Qiao X, Liu Y-H, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M and Monsma Jr. FJ (2000) ADP Is the Cognate Ligand for the Orphan G Protein-coupled Receptor SP 1999
J-Biol-Chem 276: 8608 – 8615

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A and Zechner R (2004) Fat mobilisation in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase
Science 306: 1383 – 1386

Danksagung

Für die Vergabe des Promotionsthemas und die exzellente Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie die unendliche Geduld bis zur Fertigstellung möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Martin Schmidt und Prof. Dr. med. Reinhard Klinger bedanken. Besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Astrid Barth, Prof. Dr. med. Dieter Müller und den Mitarbeiterinnen des Tierstalls für die Bereitstellung der Tiere. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Hans Herwig Ditschuneit für die Unterstützung bei der Elaborierung des luminometrischen Testverfahrens bedanken.

Meinen Eltern danke ich für immerwährende Motivation und Unterstützung, welche entscheidend zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Allen Mitarbeitern im Institut für Biochemie II, sowie allen anderen die halfen, sei ebenso herzlich gedankt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. nat. Martin Schmidt,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 20.01.2005

Ina Weise

Lebenslauf

Ina Weise

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 18. 04. 1979
Geburtsort: Jena
Familienstand: ledig, eine dreijährige Tochter

Schulbildung

09/1985 – 07/1991 Polytechnische Oberschule Magnus Poser in Jena
09/1991 – 06/1997 Carl-Zeiss-Gymnasium, Schulteil für mathematisch,
naturwissenschaftlich, technische Spezialklassen in Jena
06/1997 Abitur

Studium und Beruf

10/1997 – 12/ 2004 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 12/ 1999 Doktorandin am Institut für Biochemie II der FSU Jena bei Prof. Dr. med. R.Klinger
12/ 2004 3. Staatsexamen und Erhalt der ärztlichen Approbation
seit 01/ 2005 Assistenzärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Robert-Koch-Krankenhauses Apolda

Ort, Datum

Unterschrift

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Schödel J, Weise I, Klinger R and Schmidt M (2004) Stimulation of lipogenesis in rat adipocytes by ATP, a ligand for P2-receptors
Biochemical and Biophysical Research Communications 321: 767 - 773